

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології

Кафедра біотехнології та хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття ступеня вищої освіти бакалавр

на тему: «ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ КЛОНАЛЬНОГО
МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ БІОЛОГІЧНОГО
ПРЕПАРАТУ АЗОТОФІТ-р У ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОЩУВАННЯ КАРТОПЛІ»

Виконав: здобувач вищої освіти
за освітньою програмою Біотехнології та
біоінженерія
спеціальності 162 Біотехнології та
біоінженерія
ступеня вищої освіти бакалавр
групи 162 ББбд_2020
Моргун Арина Юріївна

Керівник: Корінний Сергій Миколайович,
кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник

Рецензент: Колупаєв Юрій Євгенович, доктор
біологічних наук, професор

Полтава – 2024 року

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології
Кафедра біотехнології та хімії

Освітньо-професійна програма Біотехнології та біоінженерія Спеціальність
162 Біотехнології та біоінженерія
Рівень вищої освіти бакалаврський

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Таміла РОМАШКО

«11» «вересня» 2024 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ
Моргун Арини Юріївни

1. Тема роботи: «Використання методу клонального мікророзмноження із застосуванням біологічного препарату Азотофіт-р у технології вирощування картоплі», керівник роботи к.с.-г.н., с.н.с., доцент Корінний С.М.

Затверджено засіданням кафедри протокол № 3 від «11» вересня 2023 р.

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи «10» червня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи: літературні дані про методику *in vitro*, сорти картоплі, поживне середовище Мурасіге-Скуга, експериментальні дані отримані на базі навчально-наукової лабораторії «Загальної біотехнології» Полтавського державного аграрного університету.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібнорозробити)

Розділ 1. Огляд літературних джерел

- 1.1. Клональне мікророзмноження рослин
- 1.2. Методи адаптації пробіркових рослин до нестерильних ґрунтових умов
- 1.3. Характеристика складу біологічного препарату Азотофіт-р та його вплив на ріст рослин
- 1.4. Вплив ризосферних мікроорганізмів на ріст рослин
- 1.5. Вітаміни в біотехнології рослин

Розділ 2. Об'єкт та методика проведення досліджень

- 2.1. Опис матеріалів необхідних для дослідження
 - 2.1.1. Характеристика сортів картоплі, обраних для дослідження
- 2.2. Методи дослідження
 - 2.2.1. Стерилізація приміщення та обладнання
 - 2.2.2. Методика приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга
 - 2.2.3. Стерилізація бульб картоплі
 - 2.2.4. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р
 - 2.2.5. Підбір оптимального вмісту вітамінного компоненту в живильному середовищі
 - 2.2.6. Протокол удосконалених технологій мікроклонального розмноження картоплі та її постасептичної адаптації
- 2.3. Технологічна та апаратурна схема для отримання рослин з використанням мікроклонального розмноження

Розділ 3. Результати досліджень

- 3.1. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р в технології вирощування картоплі методом мікроклонального розмноження
- 3.2. Вивчення впливу вітамінів на морфогенез рослин-регенерантів картоплі *in vitro*

Висновок

Список використаних джерел

5. Перелік графічного матеріалу: рисунки - 15, таблиці – 5, за темою та об'єктом дослідження.
6. Дата видачі завдання «11» вересня 2023 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1. Вибір і затвердження теми роботи.	04.09.23-11.09.23	виконано
2. Складання та погодження розгорнутого плану завдання на кваліфікаційну роботу	11.09.23-18.09.23	виконано
3. Опрацювання літературних джерел	18.09.23-20.10.23	виконано
4. Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи	23.10.23-20.11.23	виконано
5. Виконання теоретичного розділу роботи	20.11.23-12.01.24	виконано
6. Виконання аналітичних розділів роботи	15.01.24-29.03.24	виконано
7. Виконання спеціальних розділів	01.04.24-30.04.24	виконано
8. Оформлення тексту роботи	01.05.24-31.05.24	виконано
9. Попередній захист роботи на кафедрі	10.06.24	виконано
10. Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій	10.06.24-20.06.24	виконано
11. Нормоконтроль	20.06.24	виконано
12. Захист кваліфікаційної роботи	21.06.24	виконано

Здобувач вищої освіти

Арина МОРГУН

Керівник роботи

Сергій КОРІННИЙ

АНОТАЦІЯ

Моргун Арина Юріївна

Використання методу клонального мікророзмноження із застосуванням біологічного препарату Азотофіт-р у технології вирощування картоплі

Кваліфікаційна робота за освітньо-професійною програмою Біотехнології та біоінженерія спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, 2024 рік.

Метою роботи є дослідження ефективності методу клонального мікророзмноження з використанням біологічного препарату Азотофіт-р у технологіях вирощування картоплі для інтенсифікації процесу розмноження, покращення якості рослинного матеріалу та збільшення продуктивності вирощуваної культури. Об'єкт дослідження: процес клонального мікророзмноження картоплі. Предмет дослідження: вплив біологічного препарату Азотофіт-р на ефективність та якість клонального мікророзмноження картоплі.

Основна увага в роботі приділяється клональному мікророзмноженню, яке дозволяє швидко і ефективно отримувати велику кількість здорового насінневого матеріалу, що не уражений хворобами та шкідниками. Важливою складовою дослідження є застосування біологічного препарату Азотофіт-р, який містить азотофіксуючі бактерії та стимулює ріст і розвиток рослин, покращуючи їхню стійкість до стресових умов. В кваліфікаційній роботі досліджено вплив біологічного препарату Азотофіт-р на ріст та розвиток картоплі в умовах клонального мікророзмноження.

На основі проведених досліджень нами встановлено, що концентрація біопрепарату Азотофіт-р 2 мл/л поживного середовища Мурасіге-Скуга є оптимальною для вирощування картоплі методом клонального мікророзмноження.

Кваліфікаційна робота: 50 с., 15 рис., 5 табл., 88 посилань.

Ключові слова: клональне мікророзмноження, картопля, Азотофіт-р, біологічний препарат, меристема.

ЗМІСТ

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ	7
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	11
1.1. Клональне мікророзмноження рослин	11
1.2. Методи адаптації пробіркових рослин до нестерильних ґрунтових умов	19
1.3. Характеристика складу біологічного препарату Азотофіт-р та його вплив на ріст рослин	21
1.4. Вплив ризосферних мікроорганізмів на ріст рослин	24
1.5. Вітаміни в біотехнології рослин	29
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	33
2.1. Опис матеріалів необхідних для дослідження	33
2.1.1. Характеристика сортів картоплі, обраних для дослідження	33
2.2. Методи дослідження	34
2.2.1. Стерилізація приміщення та обладнання	34
2.2.2. Методика приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга	35
2.2.3. Стерилізація бульб картоплі	39
2.2.4. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р	39
2.2.5. Підбір оптимального вмісту вітамінного компоненту в живильному середовищі	40
2.2.6. Протокол удосконалених технологій мікроклонального розмноження картоплі та її постасептичної адаптації	40
2.3. Технологічна та апаратурна схема для отримання рослин з використанням мікроклонального розмноження	44
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
3.1. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р в технології вирощування картоплі методом мікроклонального розмноження	47
3.2. Вивчення впливу вітамінів на морфогенез рослин-регенерантів картоплі <i>IN VITRO</i>	51
ВИСНОВКИ	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	58
ДОДАТКИ	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКА НЕ ОПРЕДЕЛЕНА.

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

МКРР - мікроклональне розмноження рослин

МС – живильне середовище Мурасіге Скуга

PGPR – (plant growth-promoting rhizobacteria) ризосферні бактерії, що стимулюють ріст рослин

ІМК – індонілмасляна кислота

ІОК – індонілоцтова кислота

НОК – нафтилоцтова кислота

АЦК-дезаміназа - 1-аміноциклопропан-1 карбоксилат дезамінази

ЕПС – екзополісахариди

НАДФ - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

In vitro – культивування рослинних об'єктів “у склі” (пробірці, колбі, біореакторі) на штучних живильних середовищах в асептичних, часто змодельованих умовах

Ex vitro – перше постасептичне вирощування рослин in vitro

In vivo – вирощування матеріалу у природних умовах

ВСТУП

Актуальність теми: Картопля (*Solanum tuberosum L.*) є четвертою за значимістю продовольчою культурою у світі після рису, пшениці та кукурудзи. Понад мільярд людей у всьому світі використовують картоплю в їжу [5]. Вирощування картоплі вирізняється високою потребою в добривах і засобах захисту рослин [79], у тому числі на етапі виробництва насіння. Це є причиною не тільки екологічних проблем, а й підвищує собівартість продукції [71]. Більш екологічно чистий та економічний підхід до агротехніки культури може полягати у використанні агробіотехнологій на основі мікроорганізмів ризосфери, в тому числі ріст-стимулюючих бактерій (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR*) [51]. Дослідження впливу *PGPR* проведено на різних культурах в умовах *in vitro* та *in vivo*. Позитивну роль біотизації *PGPR* встановлено для рису [49], кукурудзи [58], пшениці [6, 50], сої [18], бобових [57] і соняшнику [64].

З 2005 року на Україну припадає 6,0% (19,1–19,7 млн тонн) світового виробництва картоплі. З 2005 року середня врожайність картоплі в світі становить 165-180 ц/га, але в Україні вона не перевищує 140 ц/га. великі країни (Нідерланди, США, Швейцарія) збирають понад 400 ц/га картоплі [81]. Причина цього в тому, що він вирощується після невдалого попередника, на покинутому полі, без дотримання оптимальних термінів посадки і без істотних втрат при зберіганні. Проте, все ще існують досить вагомі причини дефіциту врожаю картоплі, викликаного використанням неякісного посадкового матеріалу. В першу чергу, це стосується асортименту сортів, які не проводяться відповідно до науково обґрунтованими термінами, через порушення при заміні сортів і оновленні сортового складу [83].

Крім того, картопля відноситься до культур, які сильно уражаються хворобами і пошкоджуються шкідниками. При вирощуванні цієї культури особливо великої шкоди завдають фітофтороз, колорадський жук і вірусні захворювання. Якщо в боротьбі з першими 2-ма групами існує цілий

комплекс заходів (агротехніка, профілактика, організація, економіка, хімія), то в зв'язку з останніми - відбір у виробництві сортів, стійких до вірусів. [85].

Оздоровлений насінневий матеріал картоплі можна отримувати різними методами, але найбільш гарантована якість забезпечується розмноженням *in vitro* з використанням методу апікальної меристеми. Метод культури паросткових живців у поєднанні з подальшим клонуванням мікророслин і вирощуванням мініклубнів забезпечує високу якість еліти, але є досить витратним [82].

Зменшення витрат при отриманні посадкового матеріалу шляхом оптимізації поживного середовища, використання дорошування в тепличних умовах розсади картоплі після останнього вирощування мікророслин для кращої адаптації в умовах *in vivo* при отриманні мінібульб, забезпечення максимального виходу бульб польового покоління шляхом регулювання схеми посадки є актуальним для збільшення продуктивності в умовах виробництва [40].

Метою роботи є дослідження ефективності методу клонального мікророзмноження з використанням біологічного препарату Азотофіт-р у технологіях вирощування картоплі для інтенсифікації процесу розмноження, покращення якості рослинного матеріалу та збільшення продуктивності вирощуваної культури.

Відповідно до мети можна виділити **такі завдання:**

1. Дослідити вплив біологічного препарату Азотофіт-р на ріст та розвиток картоплі в умовах клонального мікророзмноження.
2. Оптимізувати поживні середовища за вмістом вітамінного компонента для пробіркових рослин-регенерантів у культурі *in vitro*.
3. Вивчити морфологічні характеристики отриманих рослин картоплі.

Об'єкт дослідження: процес клонального мікророзмноження картоплі.

Предмет дослідження: вплив біологічного препарату Азотофіт-р на ефективність та якість клонального мікророзмноження картоплі.

Методи досліджень: лабораторні методи (мікроклональне розмноження, а саме виділення та культивування меристеми), фізіологічні методи (аналіз росту та розвитку рослин а також кореневої системи), мікробіологічні методи, статистичні методи обрахунку отриманих результатів, графічні та методи порівняльного аналізу (порівняння результатів дослідження рослин, вирощених із застосуванням Азотофіт-р та без нього, для визначення ефективності препарату).

Наукова новизна результатів роботи полягає в тому, що вперше здійснено комплексне дослідження впливу біологічного препарату Азотофіт-р на процес клонального мікророзмноження картоплі. Удосконалено метод мікророзмноження, що дозволяє підвищити ефективність розмноження та якість рослинного матеріалу. Запропоновані підходи сприяють покращенню продуктивності та стійкості картоплі до стресових умов вирощування.

Практичне значення одержаних результатів: отримані результати створюють основу для подальшої розробки, аналізу, дослідження та вирощування картоплі *in vitro* в промислових масштабах.

Особистий внесок здобувача. Робота виконана на базі навчально-наукової лабораторії «Загальної біотехнології» кафедри біотехнології та хімії Полтавського державного аграрного університету. Весь обсяг експериментальних досліджень по темі кваліфікаційної роботи, аналіз літературних даних, обробка отриманих результатів, їх опис і аналіз виконані випускником особисто.

Структура: кваліфікаційна робота складається із вступу, 3 розділів, висновків та списку використаних джерел, що містить 88 позицій. Загальний обсяг роботи становить 51 сторінка, 15 рисунків, 5 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Клональне мікророзмноження рослин

Сучасні методи біотехнології дали змогу значно підвищити ефективність клонування рослин. Дослідження в галузі культивування соматичних тканин привели до розроблення принципово нових методів розмноження - клонального мікророзмноження. По суті, ці методи аналогічні вегетативному способу розмноження і відрізняються лише тим, що весь процес протікає в умовах *in vitro*.

У штучних умовах із клітин ізольованих тканин і органів можна прискорено отримувати досить велику кількість рослин-регенерантів. Високий коефіцієнт розмноження, повна генетична ідентичність прототипу, прискорення переходу регенерантів від ювенільної до репродуктивної стадії розвитку, можливість тривалого зберігання пробіркових рослин за зниженої температури, економія площ для вирощування та інші переваги перед розмноженням *in vivo* роблять цю технологію досить корисною для швидкого розмноження нових сортів і відібраних у ході селекції особливо цінних елітних форм. Розмноження рослин *in vitro* можливо здійснити за допомогою культури ізольованих апексів, індукції виникнення адвентивних пагонів із калюса і безпосередньо з тканин вихідних експлантів, соматичного ембріогенезу. Головна умова клонального мікророзмноження – отримання рослин, які повністю зберігають генетичну однорідність. Тому для цих цілей краще використовувати культуру апексів (меристематичних верхівок), оскільки в умовах *in vitro* вони є генетично стабільними, і тканини, що проліферують, завжди залишаються диплоїдними [38].

Одним із перших застосував метод меристематичних культур для швидкого розмноження орхідей G. M. Morel. До теперішнього часу наведено багато досліджень і відповідно опубліковано праць, у яких вивчено вплив на цей процес генетичних, фізіологічних, гормональних і фізичних чинників.

P. Limasset і P. Cornuet вдалося встановити, що концентрація вірусів у рослині знижується в міру наближення до меристематичної верхівки і меристема може бути вільна від вірусної інфекції. Тому культуру меристем *in vitro* стали використовувати для звільнення рослин від вірусів та інших патогенів. Проведеними дослідженнями показано, що клональне мікророзмноження є новим ефективним способом вегетативного розмноження, що дає змогу швидко тиражувати окремі генотипи, отримувати оздоровлений матеріал і, головне, скорочувати терміни селекційного процесу.

Нині немає єдиної класифікації методів клонального мікророзмноження. Одна з перших класифікацій належить Т. Мурасіге. На основі морфогенетичних реакцій, що реалізуються експлантатами в культурі тканин, він виділив такі методи: 1) активація пазушних меристем; 2) індукція утворення адвентивних пагонів; 3) соматичний ембріогенез [17].

G. Hussey додатково розрізняє утворення адвентивних пагонів із калусної тканини та розвиток пагонів безпосередньо з клітин експланта.

M. Nempel також описує три методи клонального мікророзмноження, в основу яких покладено поєднання морфогенетичних реакцій та етапів культивування: 1) регенерація рослин безпосередньо з клітин експланта; 2) утворення бруньок, із яких розвиваються вегетативні пагони, що активно проліферують; 3) утворення калуса, його проліферація і регенерація з нього рослин.

H. W. Kohlenbach виділяє в соматичному ембріогенезі три типи, які можуть бути використані під час мікророзмноження рослин: індукція утворення калуса з тканин вегетативних (1-й тип) або репродуктивних органів (2-й тип) і подальший соматичний ембріогенез; 3-й тип - утворення адвентивних ембріодів з ювенільних тканин рослини, минаючи стадію утворення калуса.

Деякі вчені вважають за можливе розділити процес клонального мікророзмноження на два принципово різних типи: 1) активація розвитку вже наявних у рослині меристем (апекс стебла, пазушні та сплячі бруньки стебла);

2) індукція виникнення бруньок або ембріодів *de novo*, який можна поділити на три методи: а) виникнення організованих структур безпосередньо зі спеціалізованих тканин експланта (тканин репродуктивних органів, епідермісу, мезофілу лусок, листка тощо); б) з первинного калюса, утвореного клітинами експланта; в) з пересадкової калюсної тканини або клітин, що ростуть у суспензійній культурі [21].

Клональне мікророзмноження складається з таких етапів:

1. Введення (ініціація) експлантів у культуру *in vitro* з подальшим культивуванням їх до утворення бруньок і пагонів. Цей етап включає в себе:

- вибір маточних рослин;
- поверхневу стерилізацію відібраного рослинного матеріалу;
- виокремлення експланта в стерильних умовах і поміщення його на живильне середовище в пробірку;
- культивування експланта в кліматичній кімнаті зі спеціальним і світловим режимом.

2. Власне мікророзмноження, засноване на проліферації бруньок і пагонів. Розмноження *in vitro*, що складається з одного або декількох пересадок на свіже живильне середовище, супроводжується поділом конгломератів рослин.

3. Укорінення *in vitro* розмножених мікропагонів.

4 Адаптація пробіркових рослин до нестерильних умов відкритого ґрунту.

На рис. 1.1 зображено схему, яка ілюструє процес клонального мікророзмноження картоплі із застосуванням термотерапії, етапи якого включають:

1. Термотерапія бульб: на першому етапі бульби картоплі піддаються термотерапії при температурі +38 - +40°C протягом 2-6 тижнів у темряві. Цей процес спрямований на дезінфекцію бульб і знищення патогенів, що можуть бути присутні на поверхні або всередині бульб.

2. Етіюльовані паростки: після термотерапії з бульб виростають етіюльовані паростки. Етіюляція забезпечує зменшення вмісту хлорофілу, що полегшує подальше виділення меристемних тканин.

3. Виділення меристеми: з етіюльованих паростків виділяють меристему розміром 0,2-0,35 мм. Меристема — це група недиференційованих клітин, здатних до швидкого поділу і регенерації.

4. Культивування меристеми на середовищі 1: виділену меристему переносять на спеціальне поживне середовище (Середовище 1) для культивування. Це середовище містить необхідні поживні речовини та гормони, які стимулюють ріст і розвиток рослинних тканин.

5. Індукція столоно- і бульбоутворення на середовищі 2: культивовані меристемні тканини переносять на друге середовище (Середовище 2), яке стимулює утворення столонів і бульб. Це середовище може містити специфічні фітогормони, які індукують процеси бульбоутворення.

6. Формування мікробульб на середовищі 3: після індукції столоно- і бульбоутворення рослини переносять на третє середовище (Середовище 3), де відбувається формування мікробульб. Це середовище забезпечує оптимальні умови для розвитку мікробульб, які можуть бути використані для подальшого вирощування.

7. Висаджування в ґрунт: отримані мікробульби висаджують у ґрунт для подальшого росту і розвитку. У кінцевому результаті з мікробульб виростають здорові рослини картоплі, готові до збору врожаю.

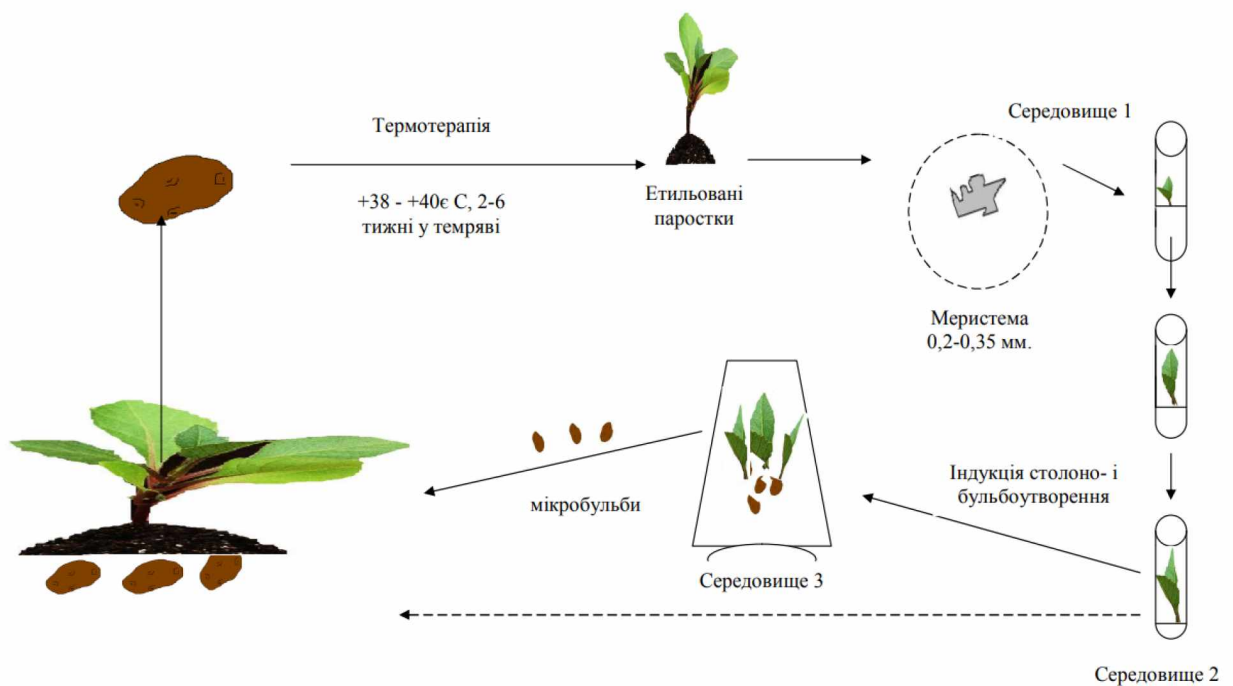


Рис. 1.1 Схема меристемного методу одержання безвірусного матеріалу картоплі

Ця схема (рис. 1.1) описує послідовний процес клонального мікророзмноження картоплі, починаючи з термотерапії бульб і закінчуючи формуванням мікробульб та їх висаджуванням у ґрунт.

На схемі (рис. 1.2) зображений процес клонального мікророзмноження картоплі, що включає два основні шляхи. Спочатку, матеріал з різних частин рослини (позначено як 1) поміщають у пробірки (2). Перший шлях передбачає культивування на спеціальних середовищах (3), з яких отримують рослини для подальшого живцювання (5). Другий шлях включає культивування меристем (4) і наступне живцювання (6). Отримані рослини поміщають у пробірки для адаптації (7) та в умовах *in vitro* (8), з подальшою висадкою у ґрунт (9).

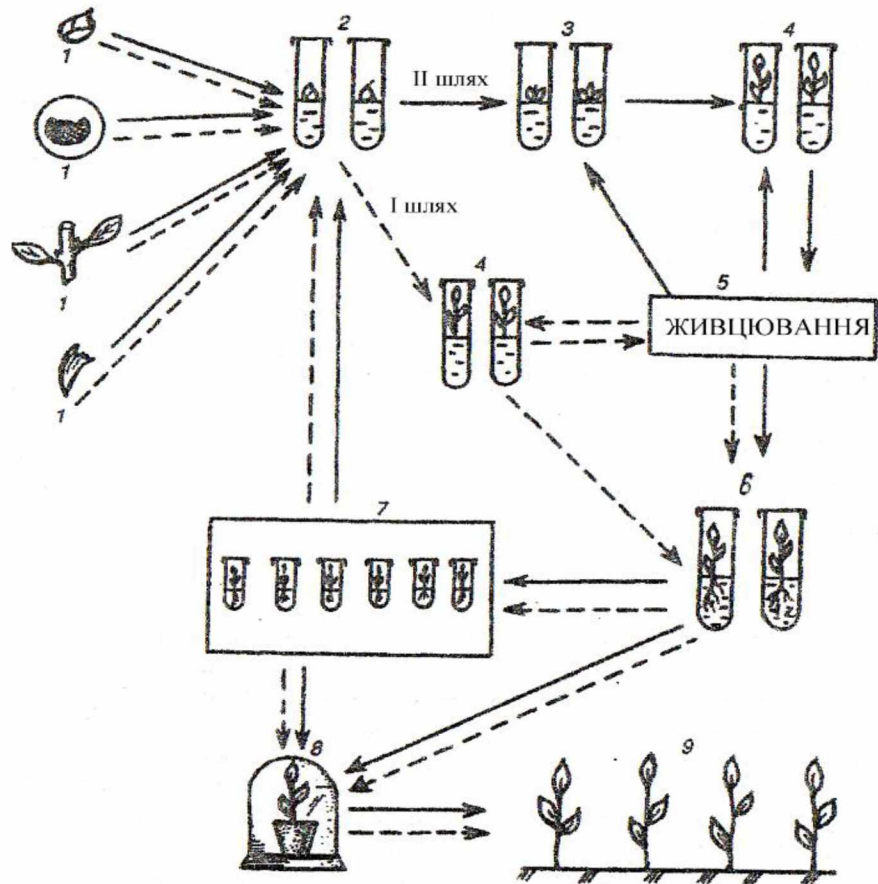


Рис. 1.2 Схема мікроклонального розмноження рослин методом активації розвитку існуючих меристем (I шлях) та індукції виникнення адвентивних бруньок на експланті (II шлях)

1 - відбір вихідного експланту; 2 - отримання стерильної культури; 3 - утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експланті; 4 - ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 - розмноження мікро пагонів (живцювання); 6 - укорінення мікропагонів; 7 - депонування рослин-регенерантів при пониженій температурі; 8 - адаптація рослин-регенерантів до субстрату і умов закритого ґрунту; 9 - адаптація рослин до умов відкритого ґрунту.

Перший етап охоплює добір вихідних рослин, стерилізацію і вичленування експлантів, створення оптимальних умов для їхнього розвитку на поживних середовищах. Важливим фактором на даному етапі мікророзмноження є стерилізація вихідного матеріалу, оскільки поверхневі тканини заражені різною мікрофлорою.

Як стерилізуючі агенти найчастіше використовують 0,1% розчин діациду, 6% розчин гіпохлориду кальцію, 0,4% розчин нітрату ртуті, 30% перекис водню, розчин «Білизни» в різних концентраціях. [69].

Кожен етап мікроклонального розмноження передбачає певний склад поживних середовищ відповідно до завдань даного етапу.

Додаткові труднощі на етапі введення в культуру створює інтоксикація рослинного матеріалу продуктами окислення фенолів, які виділяються на місці зрізу рослинних тканин. Мінеральний і гормональний склад живильного середовища мають відповідати тим завданням, які виконує середовище на кожному етапі мікророзмноження. На першому етапі до складу живильного середовища часто вводять антиоксиданти, які попереджають активацію гідролітичних ферментів і загибель висаджених експлантів. Можна, як пропонують деякі вчені, усі операції з ізолювання експлантів проводити на фільтрувальному папері, просоченому аскорбіною кислотою. Іноді перед посадкою на живильне середовище експланти доцільно занурювати на кілька годин у дистильовану воду для видалення фенольних сполук.

За експериментальними даними низки дослідників [48], додавання активованого вугілля благотворно позначається на зростанні пагонів і утворенні ембріодів. На їхню думку, активоване вугілля адсорбує токсичні речовини, що виділяються експлантом. Водночас показано, що активоване вугілля адсорбує із середовища і біологічні сполуки. Тому в такі середовища вносять більш високі концентрації фітогормонів [35].

На думку деяких дослідників, на першому етапі мікророзмноження має сенс включати в живильне середовище і такі речовини, як гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, амінокислоти. Основна мета другого етапу - власне мікророзмноження - є отримання найбільшої кількості пагонів від кожного експланта шляхом послідовного культивування вже наявних пагонів на свіже поживне середовище. На етапі мікророзмноження важливим є зняття апікального домінування.

Для індукції проліферації пазушних меристем у середовище вводять речовини цитокінінової групи: кінетин, 6-БАП, зеатин [65].

У деяких випадках склад поживного середовища на другому етапі (етап власне розмноження) залишається колишнім. В інших випадках його збагачують речовинами (переважно фітогормонами), здатними стимулювати або індукувати морфогенетичні реакції *in vitro*. На третьому етапі необхідне середовище, що забезпечує ріст стебла й укорінення рослин. Як правило, воно більш простого складу, без фітогормонів, або таке, що містить ауксини в невеликій кількості [67].

Укорінення мікропагонів є наступним важливим і трудомістким етапом, від якого залежить успіх мікророзмноження. На етапі вкорінення *in vitro* використовують пагони довжиною 1,5-3,0 см. Індукцію коренеутворення проводять в основному двома шляхами: 1) включення препаратів, переважно ауксинової групи, що сприяють коренеутворенню, безпосередньо в поживні середовища; 2) обробка базальних ділянок пагонів коренеутворювальними препаратами з подальшим культивуванням на середовищах, вільних від регуляторів росту. Деякі автори віддають перевагу останньому способу, порівняно із введенням ауксинів у живильне середовище. Однак найпростішим і найлегше доступним є введення стимулятора коренеутворення безпосередньо в середовище в концентрації 1,0-2,0 мг/л ІМК або 3,0-5,0 мг/л ІОК.

Як індуктор ризогенезу використовують індолілмасляну (ІМК), індолілоцтову (ІОК), нафтилоцтову (НОК) кислоти. Однак НОК менш придатна через рясне калусоутворення, яке ускладнює ріст коренів. Як мінеральної основи використовують розбавлені вдвічі середовища Мурасіге-Скуга і Кворина-Лепор'є, або розчин Кноппа з повним вмістом мікроелементів, заліза і вітамінів як у середовищі для розмноження.

1.2. Методи адаптації пробіркових рослин до нестерильних ґрунтових умов

Однією з проблем у розмноженні рослин, отриманих в умовах *in vitro*, є перенесення їх у нестерильні умови. На цьому етапі відбувається значна загибель рослинного матеріалу. Необхідно враховувати силу розвитку рослини, що переноситься, склад субстрату, вологість повітря і термін пересадки.

Етап адаптації до умов відкритого ґрунту є одним із найбільш критичних періодів при вирощуванні рослин регенерантів отриманих в умовах *in vitro*, оскільки рослини при цьому потрапляють у стресову ситуацію, яка в багатьох випадках призводить до їхньої загибелі. Це пояснюється фізіологічними, біохімічними та анатомічними причинами. Вважається, що під час таких пересадок рослини втрачають певні ендогенні речовини, які мають важливе значення для адаптації рослин-регенерантів до умов відкритого ґрунту [79].

Пробіркові рослини після перенесення в нестерильні умови, як встановлено, зазнають транспіраторного шоку, який зумовлений зміною цілої низки умов, насамперед вологості повітря. У культуральних посудинах вологість повітря близька до 100%, продихові щілини рослин залишаються відкритими і втрачають здатність замикатися. У зв'язку з цим використовують різні заходи спрямовані на поступову адаптацію рослин до нестерильних умов. Найчастіше з цією метою за 1,5-2 тижні до висадки в нестерильні умови з пробірок знімають пробки.

Використовують також препарати-індуктори комплексної стійкості, такі як емістим і екоств у вигляді позакореневого підживлення. На етапі адаптації основним моментом є створення умов для переведення рослин з міксотрофного типу живлення на автотрофний. У зв'язку з цим важливо правильно підібрати ґрунтовий субстрат [58]. Ряд дослідників рекомендують висаджувати вкорінені рослини *in vitro* в ящики із сумішшю торфу та піску у співвідношенні 3:1.

Деякі вчені використовують субстрат із суміші перегною і торфу у співвідношенні 1:2, закритого зверху стерильним перлітом, насиченим розчином макросолей. Інші вчені застосовують традиційні види субстратів: перліт, торф із шаром піску зверху, торф у суміші з родючою землею у співвідношенні 3:1, грубозернистий пісок, суміш торфу і піску 1:1, а також торфу і бурого вугілля у співвідношенні 1:1.

Одним зі способів поліпшення адаптації є використання нових адаптаційних субстратів, таких як іонообмінні субстрати (іонітних ґрунтів). Відомі їхні переваги для вирощування плодово-ягідних і декоративних культур. Також для кращої адаптації рослин застосовують попередню обробку водним розчином ІМК у різних концентраціях, залежно від конкретного генотипу.

Розроблено спосіб, за якого коріння рослини, отриманої в умовах *in vitro*, поміщають у ґрунтовий субстрат разом з агаризованим середовищем, на якому вони росли. Також більш вигідно, з економічної точки зору, висаджувати рослини безпосередньо в теплицю, минаючи етап адаптації в контейнерах зі стерильним субстратом. При цьому способом з січня по березень рослини активно розмножують *in vitro*, потім пересаджують на середовища для вкорінення і висаджують у ґрунт у травні-червні [84].

Найкращим часом для перенесення рослин у нестерильні умови є період початку активного росту після спокою, тому для важко адаптованих форм застосовують таку техніку, як створення штучного періоду спокою. Щоб створити рослинам такі умови, їх необхідно витримати в холодильній камері за температури 5° - 6°С протягом 40-60 днів. Завдяки цьому, перенесені в ґрунт рослини починають активно рости, швидше перебудовують систему транспірації і стають менш залежними від патогенної мікрофлори. У ґрунт рослини пересаджують у другій половині травня - на початку червня. При цьому відзначається найбільший приріст надземної частини за літні місяці вегетації і рослини мають визрілі пагони, здатні зимувати у відкритому ґрунті.

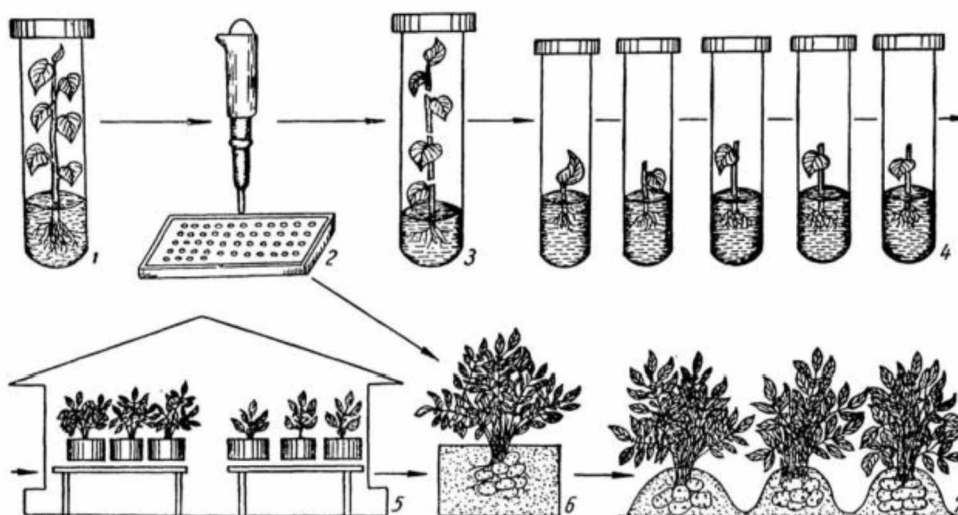


Рис. 1.3 Схема одержання оздоровленого вихідного матеріалу картоплі за допомогою живцювання рослин

1 – рослина, яка виросла з меристеми; 2 – діагностика на виявлення латентних вірусів; 3-4 – розмноження здорових клонів живцюванням у пробірках (декілька циклів); 5 – розмноження в закритому ґрунті, одержання 1-го бульбового покоління (мінібульб); 6 – розсадник вихідного матеріалу в полі; 7 – розсадник клонів, масове розмноження.

1.3. Характеристика складу біологічного препарату Азотофіт-р та його вплив на ріст рослин

Під час росту культура може не забезпечуватися необхідними поживними речовинами в достатній кількості, що, в свою чергу, впливає на врожайність та якісні характеристики врожаю. Застосування стимуляторів росту може покращити якість та кількість врожаю. Такі препарати зазвичай містять активні інгредієнти органічного походження і стимулюють ріст рослин.

Стимулятори росту рослин на основі біологічних компонентів мають переваги перед іншими хімічними препаратами:

- екологічність та безпечність для людини та довкілля, оскільки не використовуються хімічні інгредієнти;
- простота використання;
- збереження первісного смаку та складу культур.

Стимулятори та регулятори росту рослин використовуються не тільки для сприяння розвитку культур, а й для його уповільнення, якщо це необхідно.

Застосування таких препаратів дозволяє збирати врожай у зручний час і підвищує стійкість до різних хвороб та шкідників. Використання біостимуляторів росту рослин у сільському господарстві не тільки дешевше, ніж інших препаратів, але й більш доцільне з точки зору підвищеної біологічної активності.

Азотофіт – топовий біостимулятор, який довів свою ефективність як в Україні, так і в Німеччині, Болгарії, Молдові, Казахстані, Киргизії. Високу якість продукту підтвердили ключові сертифікаційні органи України та Європейського Союзу. До складу Азотофіту входять живі клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum*, завдяки яким відбувається інтенсивна фіксація азоту з атмосфери. Завдяки комплексу амінокислот, гіберлінів, ауксинів, вітамінів і органічних кислот препарат стимулює ріст і розвиток рослин та підвищує їх стійкість до несприятливих умов [86].

Біологічна дія препарату Азотофіт-р проявляється у наступному:

- фіксується молекулярний азот атмосфери та синтезуються рістстимулюючі речовини (нікотинова, пантотенова кислоти, піридоксин, біотин, гормони росту (гетероауксин, гіберелін));
- підвищується схожість насіння, енергія проростання;
- стимулюється розвиток кореневої системи та наземної маси рослин;
- покращується живлення рослин, підвищується урожайність культур та родючість ґрунту;
- зміцнюється імунітет рослин, підвищується стійкість рослин до хвороб та негативних факторів навколишнього середовища.

Основним складником біопрепарату є живі клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum*.

Таксономічна класифікація роду *Azotobacter*:

Тип *Proteobacteria*

Клас *Gamma*proteobacteria

Порядок *Pseudomonadales*

Родина *Pseudomonadaceae*

Рід *Azotobacter*, *Azotobacter chroococcum* Beijerinck

Підвиди *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum*, *Azotobacter chroococcum* subsp. *isscasi* [36].

Колонії *Azotobacter chroococcum* характеризуються кремовим кольором, круглою формою, гладко-опуклим типом. Поодинокі бактерії характеризуються паличкоподібною формою та рухливі за допомогою джгутиків. Ця бактерія населяє нейтральні та слаболужні ґрунти з оптимальним діапазоном рН 7,1-9,0.

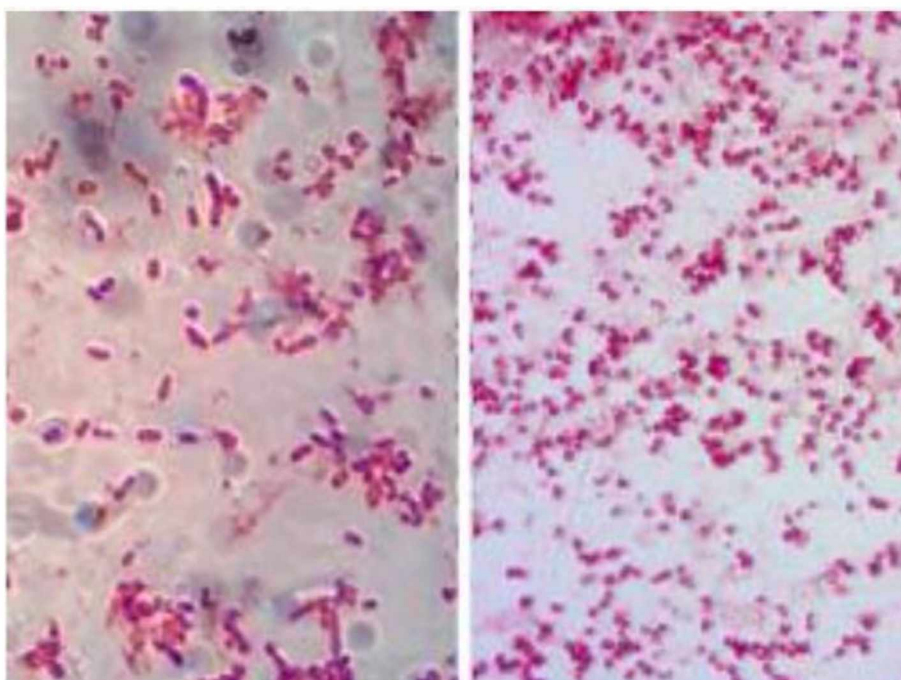


Рис. 1.4 Вегетативні клітини *Azotobacter chroococcum* (ліворуч)
і цисти (праворуч)

Найсильніший вплив *Azotobacter chroococcum* у ґрунті має загальний вміст азоту та органічного вуглецю. Сильна кореляція чисельності *Azotobacter chroococcum* із загальним вмістом азоту, швидше за все, пов'язана з його здатністю фіксувати азот. Ця бактерія важлива не лише для циклу азоту, але й для стійкості сільського господарства та рекультивації ґрунту [87].

Azotobacter chroococcum забезпечує рослини фіксованими сполуками азоту та захистом від хвороботворних мікроорганізмів, що передаються в

грунті, тоді як рослини забезпечують їх складними вуглеводами у формі корневих ексудатів. Завдяки такому взаємозв'язку *Azotobacter chroococcum* відіграє важливу роль у глобальному циклі азоту. Фіксація азоту в атмосфері (рис.1.4) відбувається за допомогою нітрогеназних систем молібдену та ванадію для виробництва аміаку, доступного в ґрунті [88].

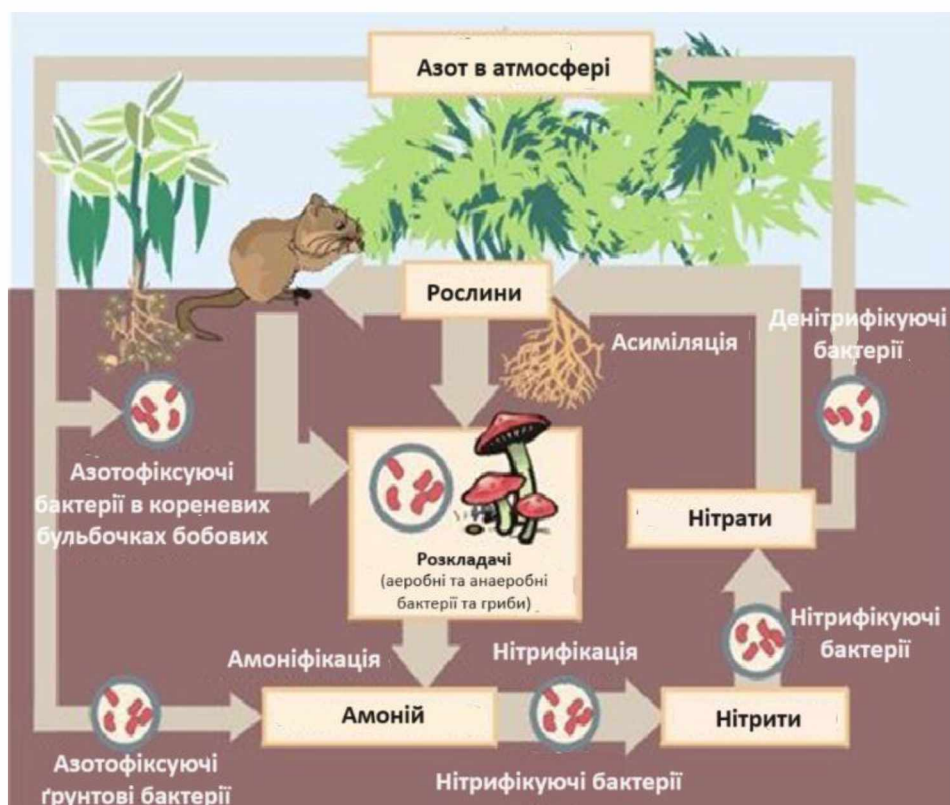


Рис. 1.5 Фіксація азоту

1.4. Вплив ризосферних мікроорганізмів на ріст рослин

Сучасне сільське господарство залежить від використання хімічних добрив і пестицидів для досягнення більш високого врожаю. Ця залежність пов'язана з такими проблемами, як забруднення довкілля, небезпека для здоров'я, переривання природного екологічного кругообігу поживних речовин і руйнування біологічних угруповань. Використання біоресурсів для заміни хімічних добрив і пестицидів зростає з кожним роком. На даний момент мікроорганізми, що сприяють росту рослин, часто є новими і потенційними

інструментами для забезпечення високого врожаю в сільському господарстві [42, 61, 66].

Оскільки мікробні інокулянти мають здатність стимулювати ріст рослин, збагачувати поживними речовинами, підтримувати здоров'я рослин [12], вони позначені як перспективна частина комплексних рішень агроекологічних проблем. Було показано, що інокуляція мікробними консорціумами або бактеріями, що сприяють зростанню рослин, підвищують ефективність використання поживних речовин, головним чином азоту і фосфору [15, 34, 39].

Рослини та мікроорганізми в природних умовах активно взаємодіють одна з одною, в тому числі встановлюючи симбіотичні відносини. Асоціації штамів *PGPR*, що стимулюють ріст рослин, варіюються за ступенем близькості бактерій до кореня. Дані мікроорганізми можна розділити на позаклітинні бактерії, які існують у ризосфері, ризоплані або в просторах між клітинами кори кореня, та внутрішньоклітинні бактерії, які існують усередині клітин кореня, як правило, у спеціалізованих вузлових структурах. До останніх належать види ризобій та франкій, які фіксують азот у симбіозі з рослинами. Під час досліджень симбіозу ризобій і бобових відбувся значний розвиток у розумінні сигнальних механізмів мікроорганізмів, і це може слугувати моделлю знань про перехресні зв'язки та механізми стимулювання росту рослин [13, 30]. Більшість бактерій, що мешкають у сфері коренів рослин, антагоністично орієнтовані по відношенню до інших мікроорганізмів. Ризосферні мікроорганізми володіють важливим біоресурсом біологічно активних речовин - антибіотиків, біосурфактантів, ферментів і осмопротекторних речовин [11, 23, 76].

У кореневій зоні рослин мешкають мікроорганізми різних систематичних груп: *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Derxia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*. Проте не всі бактерії здатні до азотофіксації [22]. Високим потенціалом азотофіксації вирізняються бактерії,

що належать до родів *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum* та інші.

Біологічна азотфіксація у бактерій, у тому числі у ризобій відбувається переважно в бульбочках коренів або стебел. Цей симбіотичний процес проявляє позитивний вплив бобових на ґрунт та їхню харчову і кормову цінність. Симбіотична азотфіксація використовує сонячну енергію, накопичену рослинами у формі органічних речовин, для відновлення інертного газу N_2 до аміаку за нормальної температури та тиску. Накопичений органічний азот є важливим компонентом харчування людини та тварин. Це визначає роль азотофіксації для сталого виробництва продуктів харчування. Таким чином, взаємодія між ризобіями та рослинами аналізується на агрономічному, фізіологічному, мікробіологічному та молекулярному рівнях, щоб отримати достатню інформацію про залучені процеси [4, 47]. Відбір штамів мікроорганізмів, може стати вирішальною стратегією для створення інноваційних методів екологічно безпечної агрономії [10, 68, 70].

Біостимулятори на основі *PGPR* широко використовуються в сільськогосподарській практиці [16]. Згідно зі світовим стратегічним бізнес-звітом про біостимулятори за 2016-2021 роки, у виробництві біостимуляторів беруть участь понад 80 світових, що охоплюють Канаду, Японію, Європу, Азіатсько-Тихоокеанський регіон, Латинську Америку та решту світу [20, 41, 44]. Біодобрива можуть мати високий потенціал у сучасній агробіотехнології [8, 9, 14, 74].

PGPR можуть сприяти росту рослин прямими та непрямими механізмами. Прямі механізми визначаються як використання тих бактеріальних ознак, які призводять до прямого стимулювання росту рослин. Вони включають вироблення ауксину, 1-аміноциклопропан-1 карбоксилат дезамінази (АЦК-дезаміназу), цитокініну, гібереліну, фіксацію азоту, солюбілізацію фосфору і зв'язування заліза бактеріальними сидерофорами. Непрямі механізми відносяться до бактеріальних ознак, які пригнічують функціонування одного або декількох патогенних організмів рослин як грибів,

так і бактерій. Ці механізми включають антибіотики, ферменти, що руйнують клітинну стінку, ціаністий водень, індуквану системну резистентність і придушення почуття кворуму. На додаток до вищезазначених методів, штами *PGPR* як біоконтроль деяких бактеріальних фітопатогенів можуть бути отримані шляхом селективного використання бактеріофагів [37, 55, 73].

Найвідомішим прямим механізмом впливу мікроорганізмів є здатність продукувати ауксин [78]. Glick встановив, що близько 80% бактерій можуть синтезувати і виділяти ауксин як вторинний метаболіт. Ауксини в рослин беруть участь у фототропізмі, геотропізмі, диференціюванні судинної тканини, поділі клітин, подовженні кореня і пагона [31, 60].

Етилен впливає практично на всі тканини рослин і стадії їхнього розвитку. На вироблення етилену в певній рослині впливають температура, світло, інші гормони, абіотичний/біотичний стрес [27]. Підвищення концентрації етилену в рослинах - це реакція на різні стреси [2, 7]. Вироблення цього гормону до порогового рівня спричиняє «етиленовий стрес», який впливає на ростові процеси рослин. Штами *PGPR*, що продукують АЦК-дезаміназу, відновлюють нормальний розвиток рослин [28], за рахунок інгібування синтезу етилену.

Мікроорганізми можуть солюбілізувати фосфор [3, 43, 46]. Бактерії перетворюють нерозчинні неорганічні та органічні фосфати на форму, яка доступна для рослин. Різні умови навколишнього середовища, ґрунту, рослин та інші бактерії впливають на дію фосфатних солюбілізаторів [25, 32, 63]. Мікроорганізми родів *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, а також несимбіотичні азотофіксатори *Azotobacter* та *Azospirillum*, є найбільш потужними солюбілізаторами фосфору [1, 62, 63].

Основним непрямим механізмом дії *PGPR* є синтез антибіотиків для протидії фітопатогенам [24, 33, 59]. Деякі антибіотики отримані з бактерій родів *Bacillus* і *Pseudomonas*. Ці мікроорганізми продукують метаболіти, які слугують противірусними, антигельмітними, антибактеріальними, протипухлинними та цитотоксичними засобами [19, 29, 45, 54].

Адгезія бактерій до коренів рослин є першим фізичним кроком у взаємодіях між мікроорганізмами та рослинами. Адгезія чинить позитивний і негативний ефект на сільськогосподарські рослини. Це залежить від того, чи з'являються стимулюючі ріст, симбіотичні або патогенні відносини між бактеріями та рослинами [75, 80].

Ризобактерії, що стимулюють ріст рослин, можуть синтезувати екзополісахариди (ЕПС) [53]. Мікроорганізми, що продукують ЕПС, можуть підтримувати більш високий вміст вологи в ґрунті. ЕПС, вироблені бактеріями, утворюють комплекс навколо коренів і захищають кореневу систему рослин від посухи тривалий час. Рослини, інокульовані бактеріями, накопичують більше цукрів, проліну, амінокислот за дефіциту води [52, 56, 72].

Однією із стресових умов для вирощування рослин це може бути сольовий стрес. На рис. 1.5 зображено основні механізми через які *PGPR* допомагають рослинам, а також результати такого виду стресу. *PGPR* допомагають зменшити негативний вплив сольового стресу, забезпечуючи підтримку для рослин через різні біохімічні та фізіологічні процеси.

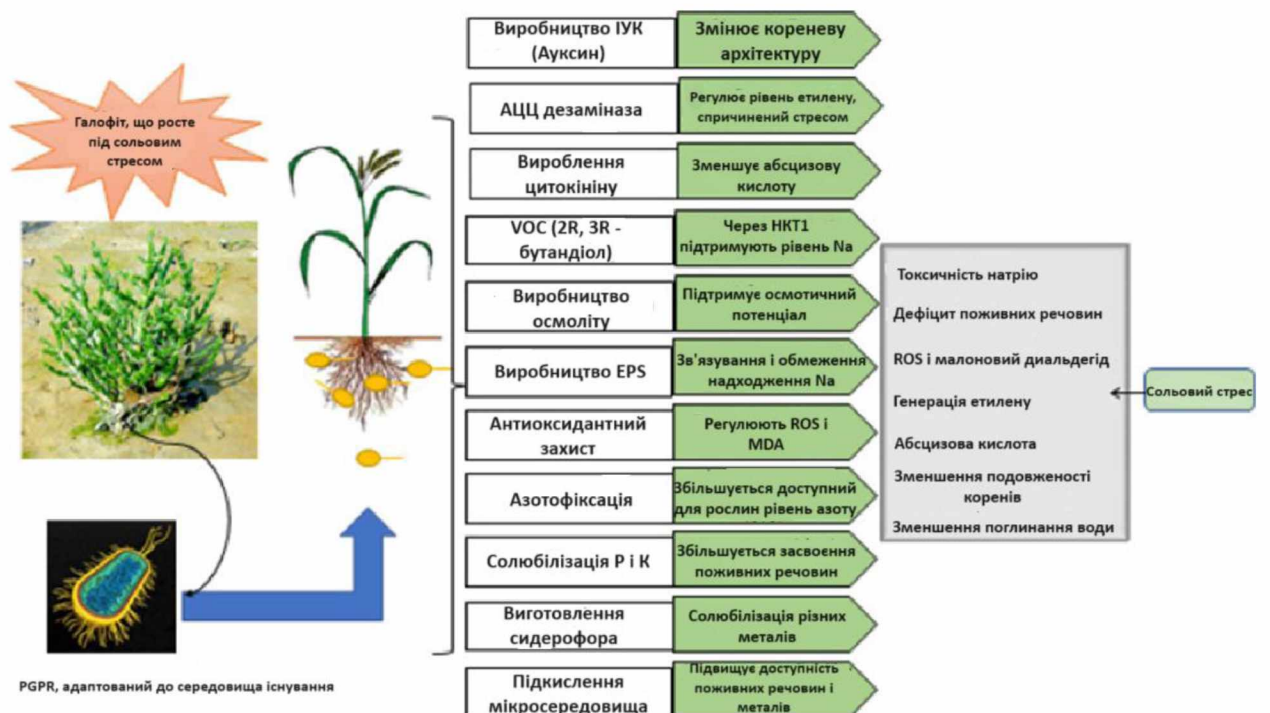


Рис. 1.6 Вплив адаптованих до середовища *PGPR* (ризобактерій, що стимулюють ріст рослин) на розвиток галофітів в умовах солевого стресу.

Взаємодії між мікроорганізмами та рослинами до кінця не вивчені, хоча стає зрозуміло, що більшість властивостей *PGPR* позитивно впливає на рослини [1]. Для успішного використання мікроорганізми мають бути здатні виживати в ґрунті агробіоценозів, де на них можуть впливати багато чинників - тип рослин, характеристики ґрунту, агротехнічні прийоми обробітку рослин [57]. Головне завдання правильно підібрати відповідні ризобактерії з конкретною рослиною та умовами навколишнього середовища для досягнення найкращих результатів зі стимулювання росту рослин [77, 78].

1.5. Вітаміни в біотехнології рослин

Більшість тканин, культивованих *in vitro*, здатні синтезувати всі вітаміни, необхідні для їх життєдіяльності. Більшість вітамінів, як відомо, входять до складу біокаталітичних ферментів різних важливих метаболічних реакцій. Багато рослинних тканин синтезують неоптимальну кількість вітамінів, і при внесенні їх в живильне середовище зростання тканин значно поліпшується. Крім того, введення вітамінів в живильне середовище може надавати регулюючу дію. Вітаміни продовжують життя експлантів і нормалізують деякі процеси росту, які відбуваються при регенерації рослин. Найважливішу роль в зростанні культури тканин відіграють вітаміни групи В.

Комплекс вітамінів В містить важливі компоненти для обміну речовин і росту рослин. Більшість цих вітамінів входить до складу дріжджового екстракту, який раніше зазвичай використовувався в культурі тканин. Тепер багато з компонентів останнього ідентифіковано і для повнішого контролю над процесами росту та розвитку їх рекомендується вносити окремо. До комплексу вітамінів В відносять цілий ряд сполук.

Тіамін (вітамін В₁) рекомендований для більшості середовищ, тому що функціонує у формі пірофосфату як кофермент циклу трикарбонових кислот (цикл Кребса). До складу середовищ вводять у вигляді хлоргідрату тіаміну в концентраціях 0,1-0,4 мг/л. Відомо, що тіамін у рослині продукує переважно

листа. Його молекула складається з двох компонентів; перший із них являє собою залишок піримідину, другий - половину молекули тіазолу [84].

У результаті досліджень, спрямованих на з'ясування ролі тіаміну в метаболізмі орхідних на стадії протокорму та ювенільних рослин, показано, що в багатьох випадках додавання в середовище тіаміну або його складових посилює ріст випробовуваних рослин і позитивно впливає на диференціацію ювенільних рослин.

Рибофлавін (вітамін В₂) активний у вуглеводному обміні і важливий для клітинного дихання. Подібно до інших водорозчинних вітамінів рибофлавін може синтезуватися в рослинах, особливо на початкових етапах розвитку насіння.

Нікотинова кислота (вітамін В₃) - універсальна сполука, яка широко трапляється як у тварин, так і в рослин. Ця речовина є попередником синтезу багатьох необхідних сполук у метаболізмі рослин. Одна з важливих функцій нікотинової кислоти проявляється в участі в синтезі НАДФ і НАФ. У багатьох рослин шляхи її метаболізму пов'язані з триптофаном, який у рослинних організмах виступає в ролі попередника ІОК. Нікотинова кислота в системі обміну речовин часто входить до складу коферментів, активних в анаболічних реакціях. Вітамін В₃ додають до багатьох середовищ зазвичай у концентраціях від 0,1 до 10 мг/л.

Аденін (вітамін В₄) важливий для клітин рослин як складова нуклеїнових кислот (ДНК і РНК). У культурі тканин має слабкий цитокініновий ефект. До складу середовищ вводиться у вигляді сульфату аденіну і використовується в основному як стимулятор адвентивного пагоноутворення.

D-пантотенова кислота (вітамін В₅) - водорозчинний вітамін, який є частиною молекули коензиму А. Активний як кофермент у жировому обміні. У середовищі для культури рослинної тканини додається у вигляді солі кальцію. Термолабільна; необхідна холодна стерилізація.

Піридоксин (вітамін В₆) також служить коферментом деяких реакцій обміну речовин. До складу середовищ зазвичай додається у формі хлоргідрату.

Ціанокобаламін (вітамін В₁₂) інколи додають до поживних середовищ для інтенсифікації ростових і формоутворювальних процесів.

Фолієва кислота утворюється в листках та інших рослинних тканинах. Дія подібна до інших вітамінів групи В. Взаємодіючи з молекулами ферментів, набуває властивостей коферменту. Застосування фолієвої кислоти в культурі рослинних тканин обмежене. Може бути використана для укорінення рослин.

n-Амінобензойна кислота (параамінобензойна кислота) іноді використовується в середовищах як антисептик. Ця сполука також бере участь в обміні фолієвої кислоти.

Інозитол (міо-інозитол) як цукровий спирт комплексу вітамінів В міститься в багатьох середовищах. У формі фосфату може входити до складу різних мембран, особливо у таких органел, як хлоропласти. Інозитол безпосередньо не стимулює ростові процеси, але сприятливо впливає на розвиток рослин-регенерантів у концентрації 100 мг/л. У рослинах інозитол бере участь у циклі синтезу поліуронідів (*polyuronides*).

L-Аскорбінова кислота (вітамін С) - найбільш відома сполука з групи вітамінів. Бере участь в окисно-відновних процесах метаболізму. Відомо, що ця сполука має деякі якості дезінфекційного засобу, проте здебільшого її використовують як потужний антиоксидант, щоб запобігти фенольному окисненню рослин, які містять фенольні смоли. Однак вітамін С не можна використовувати тривало, оскільки він може стати окислювачем безпосередньо. Встановлено, що у вищих рослин аскорбінова кислота синтезується з деяких вуглеводів (глюкоза, галактоза).

Використання аскорбінової кислоти в поживних середовищах ускладнене через її фізико-хімічні властивості - ця сполука повністю розкладається під час автоклавування середовища. Тому аскорбінову кислоту

стерилізують або через спеціальні мікрофільтри, або ж до середовища додають уже стерильну речовину, яку можна придбати в запаяних скляних ампулах.

Біотин (вітамін Н) - звичайний компонент середовищ. Важливий у метаболізмі жирів, білків і вуглеводів.

Вітамін Т - це комплекс ростостимулюючих речовин, які в літературі згадуються під назвами *tegotin*, *termitin*, *torutilin*, *temina*. Спочатку був ізольований із термітів. Структури його не встановлено; припускають, що він може складатися з кількох різних вітамінів [82].

Холін - алкалоїд із лужними властивостями; також може взаємодіяти з комплексом вітамінів В. Це відбувається природно в лецитині, який хімічно пов'язаний із жирами і містить фосфор та азот. Хлорид холіну іноді рекомендують використовувати в приготуванні середовищ.

(+)-альфа-Токоферол (вітамін Е) іноді застосовується в культурі тканин рослин. Його використовують для підтримки в підвішеному стані культур клітин. За відсутності вітаміну Е клітинні агрегати збільшуються, що неприйнятно.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Опис матеріалів необхідних для дослідження

Для дослідження ефективності методу клонального мікророзмноження з використанням біологічного препарату Азотофіт-р у технологіях вирощування картоплі нами було обрано такі сорти: Синьоока, Розара, Пікассо.

В якості біологічного стимулятора росту обрали біопрепарат Азотофіт-р, який в своєму складі містить живі клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum*.

Для клонального мікророзмноження картоплі нами було приготовлене поживне середовище Мурасіге-Скуга з різним вмістом вітамінів та біопрепарату.

2.1.1. Характеристика сортів картоплі, обраних для дослідження

Сорт Синьоока - це один з найпопулярніших сортів картоплі в Україні. Середньостиглий. Бульби великі, овальні, мають злегка плескату форму. Їх маса досягає 200 грамів. Шкірка рожева, з чітким синьо-фіолетовим відтінком. Вічки темно-сині, від чого і пішла назва. М'якоть на зрізі біла. Вміст крохмалю низький (близько 15%), сорт відрізняється високою врожайністю і чудовими смаковими якостями. Крім усього іншого, рослина проявляє хорошу стійкість до різних захворювань. При цьому рослина сильно розростається, має міцне стебло, добре розвинену кореневу систему і рясну зелену масу.

Сорт Розара - раннього дозрівання. Виведений голландськими селекціонерами. Бульби мають овальну, злегка витягнуту форму, а шкірка - рожево-червоне забарвлення. М'якоть яскрава, з жовтуватим відтінком. Бульби містять невелику кількість крохмалю (від 12%). Рослина невибаглива і стійка до нематод, фітофторозу, парші та інших захворювань.

Сорт Пікассо - пізньостиглий столовий з відмінними смаковими якостями. Висока врожайність. Період вегетації становить до 130 днів. Картопля добре зберігається. Бульби мають округлу форму і жовту шкірку з невеликими очима рожевого кольору. М'якоть світло-кремова. Маса продукту становить до 125 грам. Вміст крохмалю становить 8-13%. Сорт має гарну стійкість до картопляної нематоди, але схильний до фітофторозу.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Стерилізація приміщення та обладнання

Лабораторні інструменти, що використовували під час приготування, зберігання поживних середовищ, культивування та обробки рослинної сировини, піддавали ретельному очищенню та стерилізації. Чистий і стерильно охайний посуд є необхідною умовою успішного культивування рослинних тканин. Посуд попередньо замочували в 0,3%-му розчині перекису водню, а потім розчином миючого засобу, який після промивали проточною водою та дистиллятом.

Перед використанням після сушіння посуд прожарювали у сушильній шафі при температурі 160°C протягом 2 годин. При такій стерилізації гинуть не тільки бактерії, а також їхні спори.

Попередня стерилізація інструментів (скальпелів, пінцетів, голок і т.д.) полягала в нагріванні при температурі 140°C протягом 2 годин з подальшим висушуванням у сушильній шафі.

Перед початком і під час операції інструмент знову стерилізували в камері з ламінарним потоком, витримували в склянці з 96% етиловим спиртом, обпалювали в полум'ї спиртівки. Інструмент використовували тільки для 1 операції.

Стерилізація камер з ламінарним потоком є обов'язковим процесом, в результаті якого повинні бути усунені можливі причини зараження рослинних культур (бактерії, грибки і т.д.). Стерилізація складається з 2 етапів. На першому етапі приміщення очищається, дезинфікується та

обробляється від пилу, бруду. 2-й етап обробки – ультрафіолетова стерилізація, для якої використовуються кварцові бактерицидні лампи з експозицією 1-3 години.

Стерилізація в ламінарній камері: Ламінарна камера зазвичай оснащена ультрафіолетовою лампою, яку можна залишити на ніч для стерилізації внутрішньої поверхні. Безпосередньо перед початком роботи в ламінарній камері протирали її робочу поверхню 96% етиловим спиртом.

2.2.2. Методика приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга

Для культивування *in vitro* використовуються рідкі і щільні (тверді) середовища. Рідке середовище використовується для культивування суспензій, калюсів, ізольованих органів і тканин, регенованих рослин. Густе середовище готують на основі полісахаридів агару, які входять до складу морських водоростей, утворюючи з водою гель при рН 5,6-6,0.

У штучних поживних середовищах розчини макро- і мікросолей готують заздалегідь і використовують повторно. Вони зберігаються в спеціальних умовах: макро- і мікросолі в холодильнику в контейнерах з пробками, загорнутими в плівку при 4 °С; в невеликій ємності об'ємом 5-10 мл з вітамінами, фітогормонами, ферментами, рослинними екстрактами - пробкою (флакон з пеніциліном) при температурі 20°С. Для приготування маточного розчину макро - і мікросолей кожну сіль розчиняють в окремій склянці при нагріванні, а потім зливають до бажаної кількості.

Успіх вирощування об'єктів залежить від правильного вибору живильного середовища і ретельності його приготування. До складу живильного середовища входять макро-і мікроелементи (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Zn, Cu, Co, Mn, J, Mo), вітаміни B₁, B₆, B₁₂, PP та ін., вуглеводи (сахароза, глюкоза), рослинні гормони (найчастіше цитокінін і ауксин в певному співвідношенні).

Розроблено безліч поживних середовищ, але більшість з них являють собою модифікації основних: Мурасіге-Скуга (МС), Уайта, Шенка-Хільдебрандта, Гамборга, Лінсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека та ін. Склад деяких із цих середовищ наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Поживні середовища (концентрація речовин в г/л)

Поживні речовини	Мурасіге-Скуга (МС)	Гамборга	Уайта	Міллера
<i>Макросолі</i>				
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	10000
KNO ₃	1900	2500	80	10000
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	150	-	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	250	360	350
KH ₂ PO ₄	170	-	-	3000
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	-	150	16,5	-
(NH) ₃ SO ₄	-	134	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	200	3470
KCl	-	-	65	650
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
<i>Мікросолі</i>				
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5	16,0
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	10,0	4,5	44,0
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025	-	-
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	2,0	1,5	15,0
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,25	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,8
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	28	28	28	17,8
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,2
<i>Вітаміни</i>				
B ₁	0,1	10	0,1	-
B ₆	0,5	1,0	0,1	-
PP	0,5	1,0	0,5	
Сахароза	30000	20000	20000	
Агар-агар	0,8%	0,8%	0,8%	
pH	5,6-5,8	5,5	5,6-5,8	5,6-5,8

Зі складом найбільш популярних поживних середовищ можна ознайомитися в довідниках з фізіології рослин і біотехнології. Зазвичай це рецептури базових середовищ для культивування рослинних клітин: середовище Мурасіге-Скуга і середовище Гамборга.

Приготування маточного розчину живильного середовища для рослинних клітин. Зазвичай готують кілька маточних розчинів - макроелементи, хелатне залізо, мікроелементи, хлорид кальцію, вітаміни, їх зберігають в окремих колбах, а під час приготування середовища їх зливають в зазначеному вище порядку. Це робиться для того, щоб при взаємодії солей не відбувалося утворення осадів.

Макросолі зважували на технічних вагах, розчиняли окремо в невеликій кількості двох дистилатів і доводили в колбі до обсягу, в 10 разів меншого, ніж необхідний обсяг по відношенню до середовища, тобто на 1 літр загального обсягу живильного середовища беруть 100 мл розчину макросолей. Іноді це співвідношення змінюється, концентрація збільшується в 10 разів кожна, і кількість маточного розчину, взятого для приготування 1 літра живильного середовища, також змінюється.

Мікросолі хелатного заліза розчиняли окремо, перемішували і доводили до об'єму кінцевої концентрації 50 мл/л.

Мікроелементи зважували на аналітичних вагах і розчиняли таким чином, щоб кінцева концентрація відповідала 1 мл розчину на 5 літрів готового середовища. Тобто для приготування живильного середовища беруть по 5 мл кожного. Отриманий розчин перелили в стакан з щільно закритою кришкою, наклеїли етикетку і поставили в холодильник. Хелатні комплекси заліза зберігають в темному склі.

Вітамінний препарат - на етикетці написано 1%, 5% і 6% розчин тіамінухлориду, нікотинової кислоти або будь-якого іншого необхідного вам вітаміну. Це означає, що для приготування 1%-го розчину було взято 1000 міліграмів речовини і розчинено в 100 мл води. Таким чином, в кожному мл цього розчину міститься 10 мг вітамінів. Стандартна аптечна упаковка являє собою капсулу об'ємом 1 мл це означає, що кожна капсула містить 1 міліграм вітамінів для 10%-го розчину і 5 міліграмів для 50%-го.

Концентрований розчин вітамінів готують з розрахунку додавання 1 мл на 5 літрів середовища. Під час приготування середовища флакон з

вітамінами виймали з холодильника, розморожували, замочували в гарячій воді і переливали в колбу з живильним середовищем.

Рослинні гормони (ауксин і цитокинін) спочатку розчиняють в 2 мл 96% C_2H_5OH (або 0,1 н. $NaCl$), потім додають 98 мл води, доводять об'єм до 100 мл і зберігають при температурі 2-4°C. Нами було використано біологічний стимулятор росту Азотофіт-р.

Для економного використання часу і зусиль готують концентровані розчин макро-, мікросолей, вітамінів і гормонів, які зберігаються в холодильнику при температурі 4°C не більше 1 місяця. Вітамінні розчини можна заморозити і зберігати в невеликих кількостях до 2 тижнів. Умови зберігання наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Маточні розчини для середовища Мурасіге-Скуга

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1 л середовища, мл
Макросолі, г на 0,5 л маточного розчину			
KNO_3	19,0	4 °C	50
NH_4NO_3	16,5		
KH_2PO_4	1,7		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,7		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4		
H ₂ O довести до 0,5 л			
Fe-хелат, мг на 200 мл маточного розчину			
$Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$	1114	4 °C	5
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	1490		
Мікросолі, мг на 100 мл маточного розчину			
H_3BO_3	62	4 °C	10
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	241		
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	86		
KI	8,3		
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2,5		
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	По 10 мг солей розчинити в 40 мл H ₂ O. 1 мл розчину додати до 100 мл стоку мікросолей.		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$			

2.2.3. Стерилізація бульб картоплі

Для поверхневої стерилізації використовується значна кількість хімічних речовин, зазвичай активний хлор (гіпохлорит натрію, хлористе вапно, гіпохлорит кальцію, хлорамін), дихлорид ртуті (сулема), перекис водню. Рідко використовуються бром, сірчана кислота та антибіотики.

Перед стерилізацією, бульби ретельно промивали під проточною водою з миючими засобами, споліскували дистильованою водою та очищали.

Бульбу наколювали на стерильний ланцет і опускали у фарфорову склянку з 96% етиловим спиртом, потім обпалювали в полум'ї спиртівки.

За допомогою стерильного свердла з них виймали циліндри тканин, поміщали у чашку Петрі, відсікали обпалені краї і розділяли на диски шириною 1,2-1,5 мм.

Основні методи стерилізації органів рослин при введенні їх у культуру *in vitro* наведено у додатку А.

2.2.4. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р

На даний час єдиною ефективною методикою виробництва оздоровленого насінневого матеріалу картоплі є вирощування ертифікованих міні-бульб з повністю вільних від патогенів меристемних мікророслин. Поживне середовище є одним із головних чинників, що впливають на ріст і розвиток меристемних рослин картоплі, воно містить необхідні для морфогенезу рослин макроелементи та мікроелементи, вітаміни, вуглеводи та регулятори росту. Основним середовищем для мікроклонального розмноження картоплі є поживне середовище Мурасіге-Скуга в різних модифікаціях. Однак продовжує залишатися актуальним питання підвищення ефективності процесу відтворення оздоровленого матеріалу картоплі шляхом зміни параметрів культивування, добору оптимального поєднання компонентів поживного середовища і створення нових поживних середовищ, у тому числі стосовно і для конкретних сортів картоплі. Велике значення має

модифікація поживних середовищ із використанням різних біостимуляторів і препаратів комплексної дії, що підвищують стійкість рослин картоплі до різних стресових факторів і збільшують врожайність і якість продукції [26, 40].

При проведенні мікророзмноження картоплі використовувалося поживне середовище Мурасіге-Скуга, одним із складників якого був біопрепарат Азотофіт-р. Готуючи середовище нами було запропоновано 2 концентрації даного препарату, а саме: 1 мл/л та 2 мл/л. Контролем виступало середовище, яке не містило у своєму складі біопрепарату.

2.2.5. Підбір оптимального вмісту вітамінного компоненту в живильному середовищі

Вітамінний компонент живильного середовища становили такі вітаміни: тіамін 0,1 мг/л; піридоксин 0,5 мг/л; і нікотинова кислота 0,5 мг/л. Для підбору оптимального вмісту вітамінного компонента в живильному середовищі використовували різні концентрації 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 5 мкМ.

В якості культуральних посудин використовували пробірки об'ємом 10 мл, заповнюючи їх поживним середовищем по 3-4 мл. Як експланти використовували мікрочерешки, виокремлені із середньої частини рослини з однією пазушною брунькою та листком.

Через 20 діб фіксували такі показники розвитку рослин: висота пагона, мм; число міжвузлів, шт./експл.; кількість коренів, шт./експл.; довжина коренів, мм.

2.2.6. Протокол удосконалених технологій мікроклонального розмноження картоплі та її постасептичної адаптації

Вирощування ізольованих експлантів рослин вимагає суворого дотримання технічних прийомів. Всі вони розділені на 4 групи відповідно до порядку виконання:

I. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування;

II. Розмноження *in vitro*;

III. Укорінення *in vitro/ex vitro*;

VI. Постасептична адаптація.

Насінництво картоплі базується на біотехнологічних методах, які забезпечують покращення та розмноження перевіреної безвірусної сировини. Технологія розмноження картоплі включає наступні етапи: відбір материнських рослин (клонів) у польових умовах - термічна обробка бульб - ізоляція нащадків - регенерація рослин з нащадків - МКРР *in vitro* - вирощування рослин у теплицях та в польових умовах.

I. Відбір маточних рослин, знезараження експлантів та первинна культура. На цьому етапі використовують такі методи: відбір найкращих кущів, теплову або хіміотерапію, виділення та культивування меристематичної тканини.

Бульби сортують за морфологічними ознаками основних сортів і перевіряють на наявність прихованої вірусної інфекції.

Гіпертермія бульб. Для термотерапії відбирають бульби після сезону спокою, в типовій для сорту формі і без поверхневих пошкоджень або грибової інфекції. Бульби ретельно миють і поміщають в кювети, заповнені піском. Термічну обробку проводять у термобоксі в темному приміщенні з автоматичним регулюванням температури в межах 37-39°C. Вологість підтримується на рівні не менше 75%, а освітлення в боксі вмикається лише під час догляду за бульбами. За таких умов на бульбах формуються довгі паростки. Тривалість і параметри теплової терапії визначаються як видовим складом вірусу, так і біологічними властивостями сорту. Зазвичай вона триває від 2 до 12 тижнів.

Виділення меристематичної тканини. Для виділення меристематичної тканини у термічно оброблених бульб зрізають верхівки пагонів (2-3 см завдовжки). Їх стерилізують у розчині гіпохлориту натрію. Для цього пагони

замочують у розчині на 3-5 хв і тричі промивають стерильною дистильованою водою.

Виділяють меристематичну тканину з пагонів за допомогою біокулярного стереомікроскопа з великою сіткою і збільшенням не менше 24х. Для виділення меристематичної тканини використовуйте велику, добре загострену медичну голку (діаметром приблизно 2 мм і довжиною 10-15 см).

Бруньку переносять на предметне скло мікроскопа, притримують пальцем або стерильним пінцетом і згинають тканинний листок на верхівці бруньки. Останні 3-4 рудиментарних листки складають під мікроскопом за допомогою голки шприца, щоб звільнити меристематичну тканину від покривного скла; меристематичну тканину товщиною 100-200 мкм з одним первинним листком відокремлюють двостороннім надрізом голкою, кінчик голки переносять в агаризоване живильне середовище в пробірці, вводять голку в агар і розрізають агар на 1/2 діаметра пробірки шляхом Розрізаючи плавно (рухаючись від центру до стінки), меристематична тканина залишається в пробірці.

Потім пробірку поміщають у спеціальну камеру з регульованим освітленням, вологістю та температурним режимом. Температура культури меристематичної тканини становить 24-25°C, освітленість 4-12 тис люкс, фотоперіод 16 годин. Регенерація з меристематичної тканини рослин *in vitro* займає 2-8 місяців. Протягом цього періоду експланти переносять на нове середовище кожні 10-15 днів. Залежно від стану меристеми кількісно і якісно змінюється вміст наступних гормонів: ІОК, кінетину та гібереліну.

Отримані рослини розмножують і одночасно тричі тестують на вірусну інфекцію за допомогою імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції.

II. Прискорене розмноження *in vitro*. Залежно від виробничих потреб, розсада та мікроклубні виробляються в стерильних умовах. Живцювання використовується для збільшення необхідної кількості. Живці виймають з пробірки в асептичних умовах і відокремлюють листя і пазушні бруньки

стебла один від одного (рис. 2.1). Ділянка стебла над листком повинна бути в 2-3 рази коротшою, ніж ділянка стебла під листком [84].

Живці висаджують у пробірки з живильним середовищем на глибину міжвузля, через 18-22 дні рослини відростають і використовуються для повторного живцювання до отримання необхідної кількості рослин. За допомогою пробіркового методу живцювання за 3-4 місяці можна отримати 2-3 тис. рослин, придатних для пересадки в ґрунт. Це означає, що за 8-10 місяців коефіцієнт розмноження на одну рослину становить приблизно 20 тис.

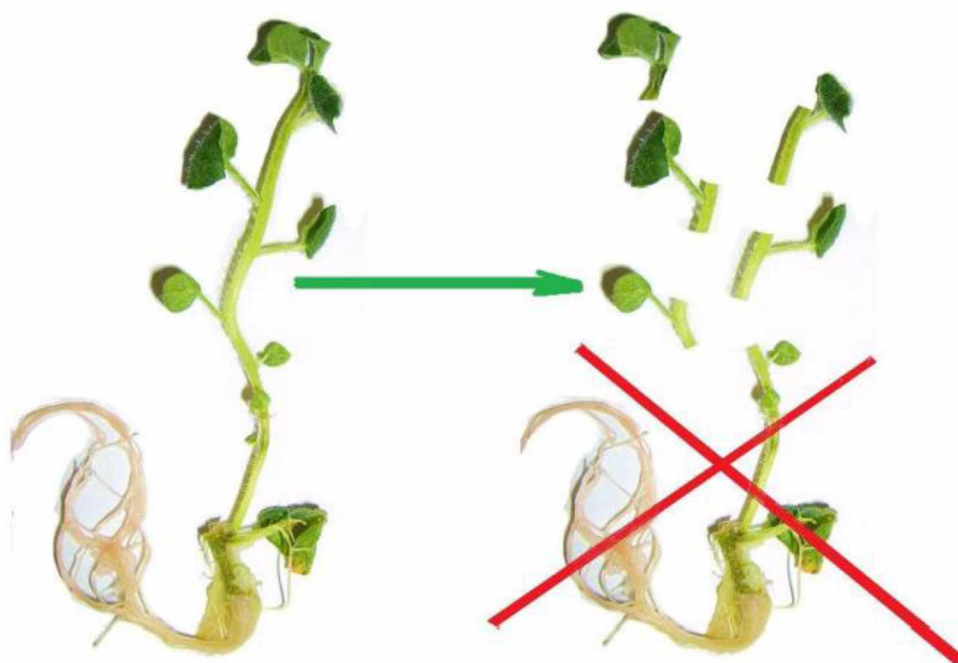


Рис. 2.1 Поділ рослин картоплі на живці

Для отримання мікробульб *in vitro* використовують середовище з високим вмістом мінеральних речовин і вуглеводів та регульованим фотоперіодом. Важливими для формування стolonів і бульб є висока концентрація сахарози в середовищі (4-8%) і 16-годинний фотоперіод протягом перших 10-15 днів, після чого слідує короткий фотоперіод 4-10 годин протягом 35-45 днів. Більшість сортів формують бульби за 55-60 днів *in vitro*.

Вирощування темнових мікробульб методом культури одного вузла. Регулювання температури інкубації пробіркової культури може впливати на

специфічні ознаки генетичної програми, притаманні певному виду рослин: при температурі 18-26°C з живців розвиваються пагони і лише через 30-50 днів починається формування стебла і бульб, тоді як при температурі вирощування 12-16°C з живців відразу формуються стеблові листки і бульби. При температурі вирощування 12-16°C стебла, листя і бульби утворюються відразу після проростання живців.

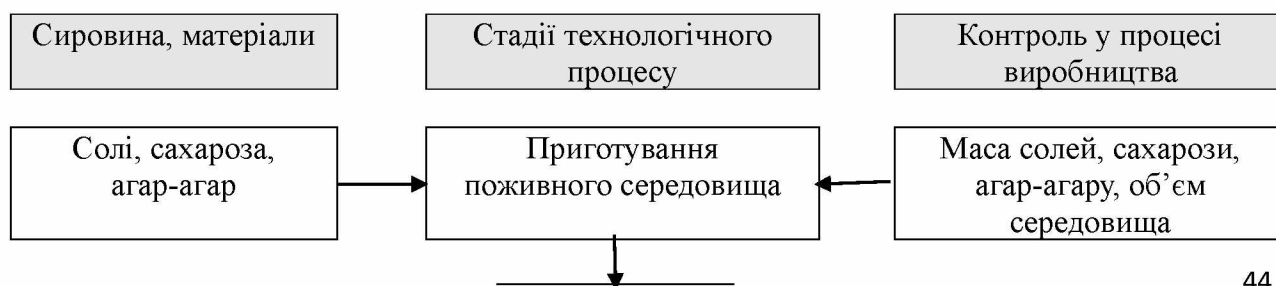
При утриманні живців при низькій позитивній температурі (преінкубація) протягом 1-2 днів з подальшим температурним режимом 18-26°C розвиток живців прискорюється так само, як і при постійній температурі. Цей метод дозволяє скоротити період освітлення до 7 днів для ранньостиглих сортів і до 10 днів для середньостиглих, таким чином зменшуючи витрати на електроенергію та амортизацію обладнання.

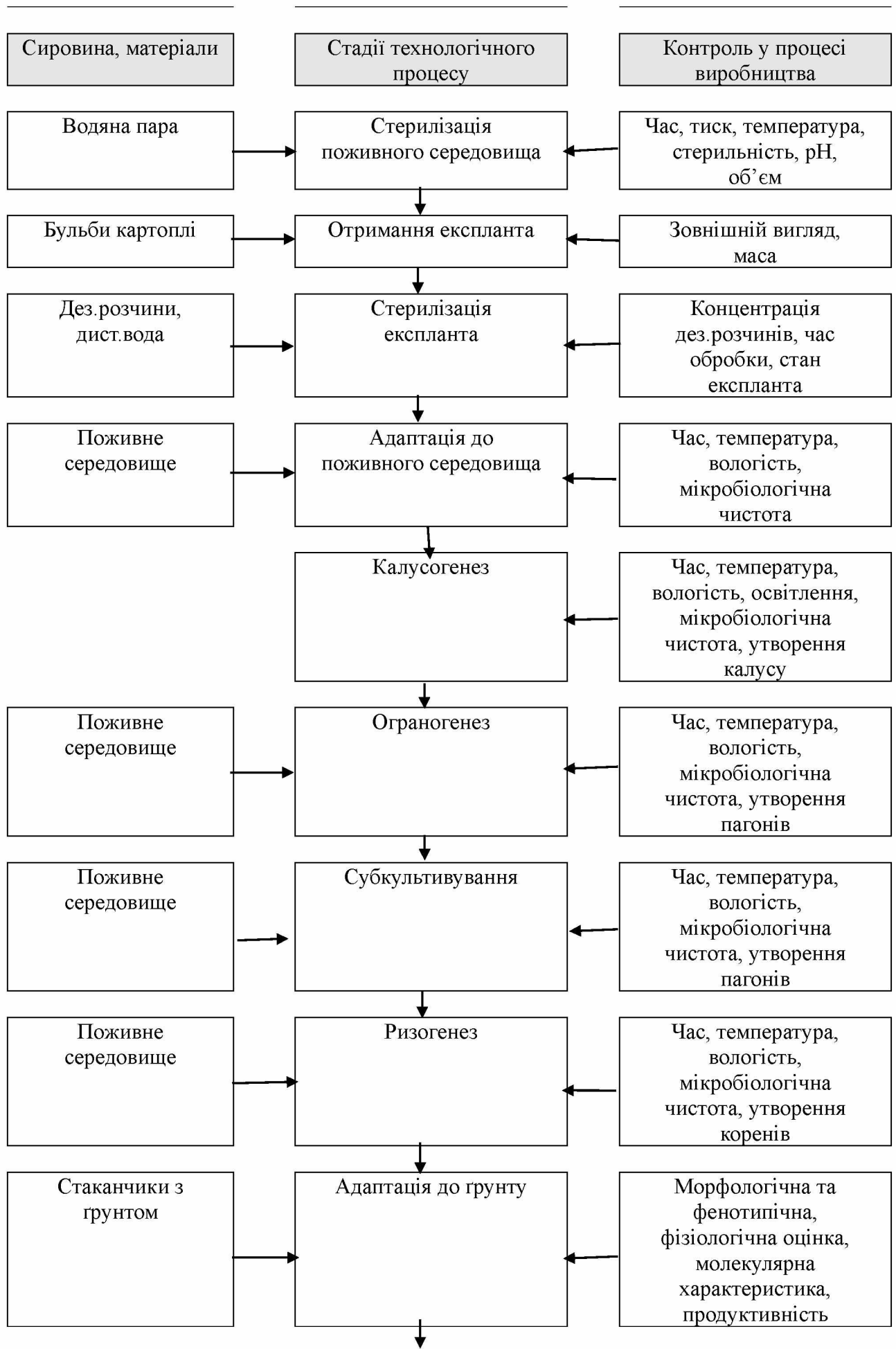
Зібрані «темнові мікробульби» зберігають під розсіяним світлом протягом одного тижня перед посадкою.

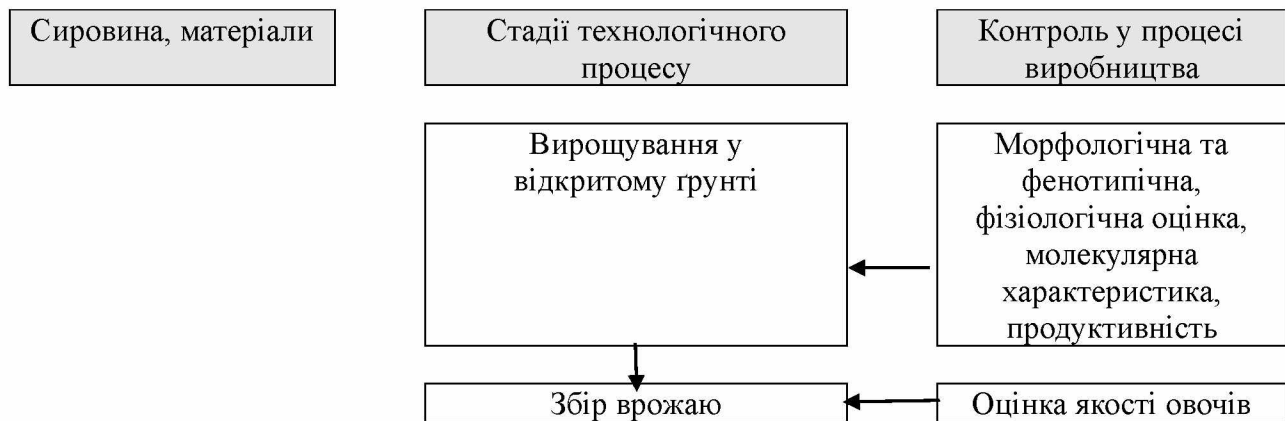
Виробництво розсади для міні-бульб. Розсаду можна отримати як шляхом вирощування рослин *in vitro*, так і *in vivo* шляхом живцювання на субстраті у вологій камері та укорінення верхівкових і пазушних пагонів; після встановлення рН до 6,0 в якості субстратів використовують перліт, водний мох, гідрогель і пластигар. Джерелом поживних речовин є розчин мінеральних солей за Мурасіге та Скугом [84].

2.3. Технологічна та апаратурна схема для отримання рослин з використанням мікроклонального розмноження

Структурна схема виробництва картоплі з використанням технології мікроклонального розмноження наведена нижче і включає в себе наступні основні етапи:







Основні етапи та обладнання, що використовуються у процесі мікроклонального розмноження рослин, забезпечуючи стерильні умови та контрольоване середовище для успішного вирощування та регенерації рослинних культур зображено на рис. 2.2.

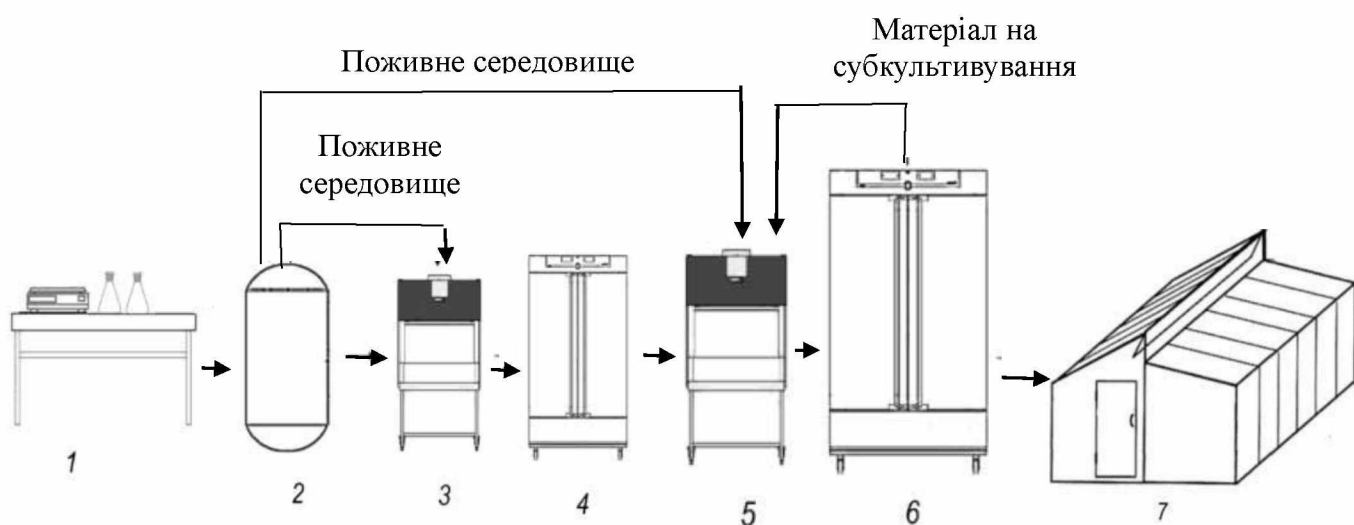


Рисунок 2.2 Апаратурна схема мікроклонального розмноження

1 – Зона зважування та приготування поживного середовища; 2 – Автоклав для стерилізації поживного середовища; 3, 5 – Ламінарна шафа для проведення посівів; 4 – Ростильна камера на 100 л для отримання калусу; 6 – Ростильна камера на 750 л для отримання рослин-регенератів; 7 – Теплиця для висадки рослин у ґрунт.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Визначення оптимальної концентрації біологічного препарату Азотофіт-р в технології вирощування картоплі методом мікроклонального розмноження

У результаті клонального мікророзмноження картоплі було отримано дані, що відображають залежність кількості експлантів, а також росту рослин та коренів від вмісту та концентрації біопрепарату Азотофіт-р у поживному середовищі МС. Зокрема, спостерігалось значне збільшення кількості експлантів при підвищенні концентрації біопрепарату, досягаючи максимуму при 2 мл/л для всіх досліджуваних сортів картоплі. Детальна інформація щодо кількісних показників експлантів, динаміки росту рослин і розвитку кореневої системи представлена в таблицях та графіках, що додаються. Отримані результати підкреслюють ефективність використання Азотофіт-р у мікроклональному розмноженні картоплі, сприяючи покращенню продуктивності процесу вирощування.

Таблиця 3.1

Кількість експлантів картоплі в залежності від концентрації Азотофіт-р

Концентрація біопрепарату Азотофіт-р в середовищі, мл/л	Кількість експлантів, шт		
	Сорт Синьоока	Сорт Розара	Сорт Пікассо
0 (контроль)	3	4	2
1	6	6	4
2	7	9	7

Результати дослідження показали, що застосування біопрепарату Азотофіт-р у мікроклональному розмноженні картоплі значно впливає на кількість отриманих експлантів для сортів Синьоока, Розара та Пікассо. Зокрема, у контрольній групі (0 мл/л) кількість експлантів становила 3, 4 та 2 відповідно. Максимальні результати були отримані при концентрації 2 мл/л, де кількість експлантів становила 7 для сорту Синьоока, 9 для сорту Розара та 7 для сорту Пікассо.

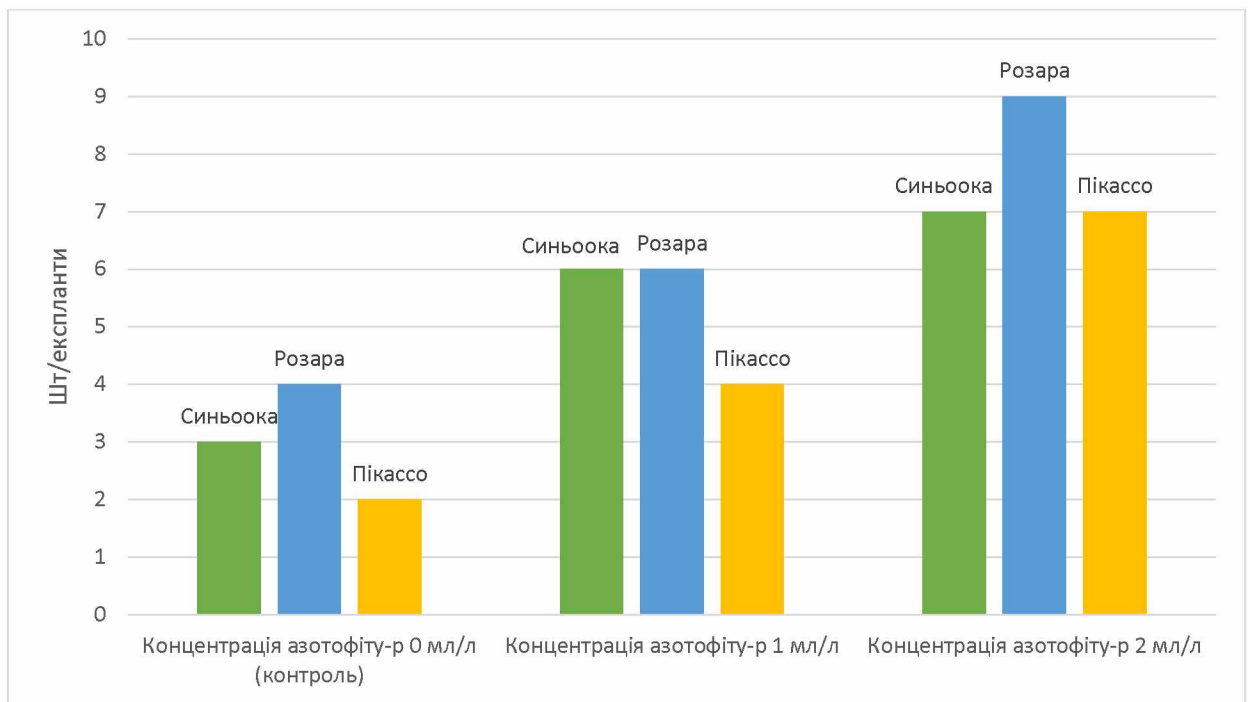


Рис. 3.1 Динаміка зміни концентрації Азотифіт-р, мл/л

Експериментом показано (Рис. 3.1), що збільшення концентрації біопрепарату Азотифіт-р в середовищі сприяє підвищенню кількості отриманих експлантів для всіх трьох сортів картоплі. Сорт Розара показав найкращі результати при обох концентраціях препарату, отримавши максимальну кількість експлантів (9) при концентрації 2 мл/л. Сорти Синьоока та Пікассо також демонструють значне збільшення кількості експлантів з підвищенням концентрації біопрепарату, досягаючи максимуму при 2 мл/л.

Ці результати підтверджують ефективність використання біопрепарату Азотифіт-р у мікроклональному розмноженні картоплі, сприяючи підвищенню кількості експлантів і, відповідно, покращенню продуктивності процесу вирощування.

Зміна росту рослин та коренів картоплі при клональному мікророзмноженні в залежності від концентрації біопрепарату Азотофіт-р

Концентрація біопрепарату Азотофіт-р в середовищі, мл/л	Ріст рослин, мм			Ріст коренів, мм		
	Сорт Сньоока	Сорт Розара	Сорт Пікассо	Сорт Сньоока	Сорт Розара	Сорт Пікассо
0 (контроль)	10	12	11	11	14	13
1	15	18	17	17	20	19
2	20	25	22	23	26	25

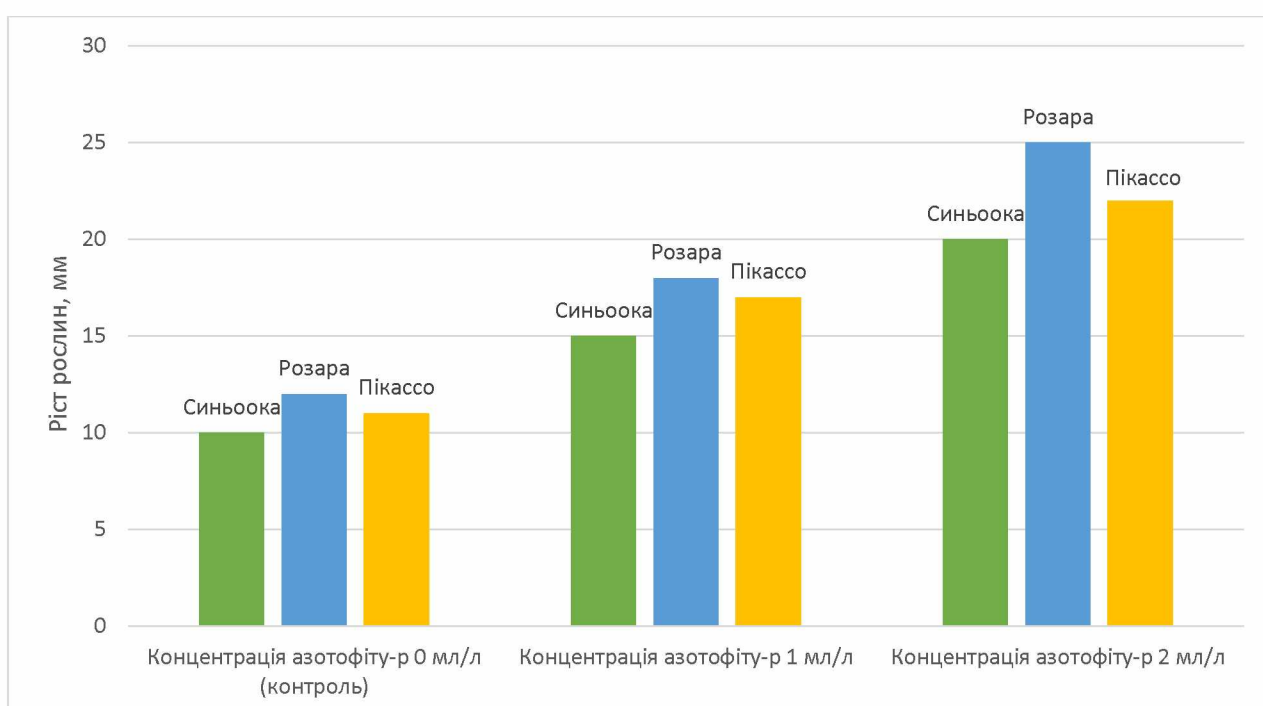


Рис. 3.2 Ріст рослин картоплі при клональному мікророзмноженні в залежності від концентрації біопрепарату Азотофіт-р

Як показало дослідження картопля сорту Сньоока мала зріст рослин, який збільшувався від 10 мм при контролю до 20 мм при концентрації біопрепарату Азотофіт-р 2 мл/л. Картопля сорту Розара мала найбільший зріст при концентрації препарату 2 мл/л, де він досягає 25 мм. Показує стабільний ріст від 11 мм (контроль) до 22 мм при концентрації біопрепарату 2 мл/л картопля сорту Пікассо (рис. 3.2). Ці результати підкреслюють

ефективність Азотофіт-р у стимулюванні росту рослин різних сортів картоплі. З досліджуваних сортів картоплі, Розара показала найбільший зріст рослин при концентрації біологічного препарату Азотофіт-р 2 мл/л середовища МС.

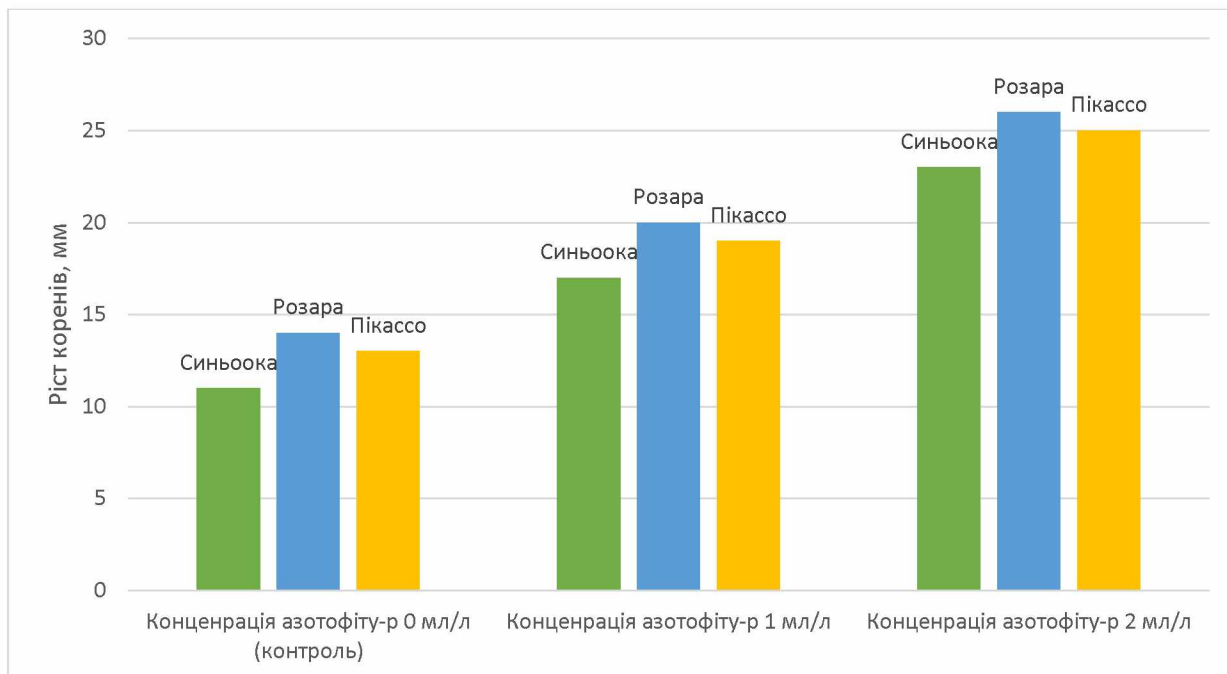


Рис. 3.3 Ріст коренів картоплі при клональному мікророзмноженні в залежності від концентрації біопрепарату Азотофіт-р

Досліджуючи динаміку росту коренів картоплі різних сортів в залежності від концентрації біологічного препарату Азотофіт-р ми отримали результати, які відображені на рис. 3.3. Для картоплі сорту Синьоока довжина коренів збільшується від 11 мм до 23 мм при контролі та концентрації препарату 2 мл/л відповідно. Найбільшу довжину коренів показали сорт Розара та Пікассо, які становлять 26 мм та 25 мм відповідно при концентрації біопрепарату 2 мл/л середовища МС. За даними діаграм можемо чітко оцінити, як різні концентрації Азотофіт-р впливають на ріст рослин та коренів різних сортів картоплі.

За результатами морфологічних спостережень: рослини картоплі, вирощені у середовищі з додаванням Азотофіт-р, мали більшу висоту, більшу кількість листків та більший розмір листкової пластинки порівняно з

контрольними рослинами; їх коренева система була більш розгалужена і мала більший об'єм, що свідчить про покращення поглинання поживних речовин; кількість та розмір бульб також були більшими у рослин, вирощених з додаванням біопрепарату (таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Морфологічні характеристики сортів картоплі

Параметр	Контроль	1 мл/л Азотофіт-р	2 мл/л Азотофіт-р
<i>Сорт Синьоока</i>			
Висота рослин (мм)	10	15	20
Кількість листків	5	7	10
Розмір листкової пластини (мм ²)	30	45	60
Об'єм кореневої системи (см ³)	20	35	50
Кількість бульб	3	5	7
Розмір бульб (мм)	15	20	25
<i>Сорт Розара</i>			
Висота рослин (мм)	12	18	25
Кількість листків	6	9	12
Розмір листкової пластини (мм ²)	35	50	70
Об'єм кореневої системи (см ³)	25	40	60
Кількість бульб	4	6	8
Розмір бульб (мм)	18	23	30
<i>Сорт Пікассо</i>			
Висота рослин (мм)	11	17	22
Кількість листків	5	8	11
Розмір листкової пластини (мм ²)	32	47	65
Об'єм кореневої системи (см ³)	22	37	55
Кількість бульб	3	5	7
Розмір бульб (мм)	16	21	28

3.2. Вивчення впливу вітамінів на морфогенез рослин-регенерантів картоплі *in vitro*

У результаті виконаної роботи було отримано дані, що відображають залежність морфологічних параметрів рослин від вмісту вітамінного компонента в живильному середовищі. Спостерігається позитивний вплив на морфологічні параметри розвитку рослин усіх вивчених сортів картоплі.

При дослідженні впливу концентрації вітамінного компонента в живильному середовищі, у досліджуваних сортів картоплі спостерігалася різна фізіологічна відповідь. Для кожного досліджуваного сорту картоплі були відзначені концентрації, на яких відбувалося посилення ростового

потенціалу рослини, а також концентрації, використання яких чинить стримувальний вплив на ріст рослин.

Під час проведення етапу власне розмноження важливо за короткий термін отримати рослини певної морфологічної структури - високі рослини з великим числом міжвузлів. Облистяність рослин слугує показником їхньої потенційної енергії росту, тому що листя - місце детермінації фізіологічних процесів, що відбуваються в рослинах. Результати впливу вітамінного компонента на висоту та кількість міжвузлів рослин-регенерантів відображено на рис. 3.4 та 3.5.

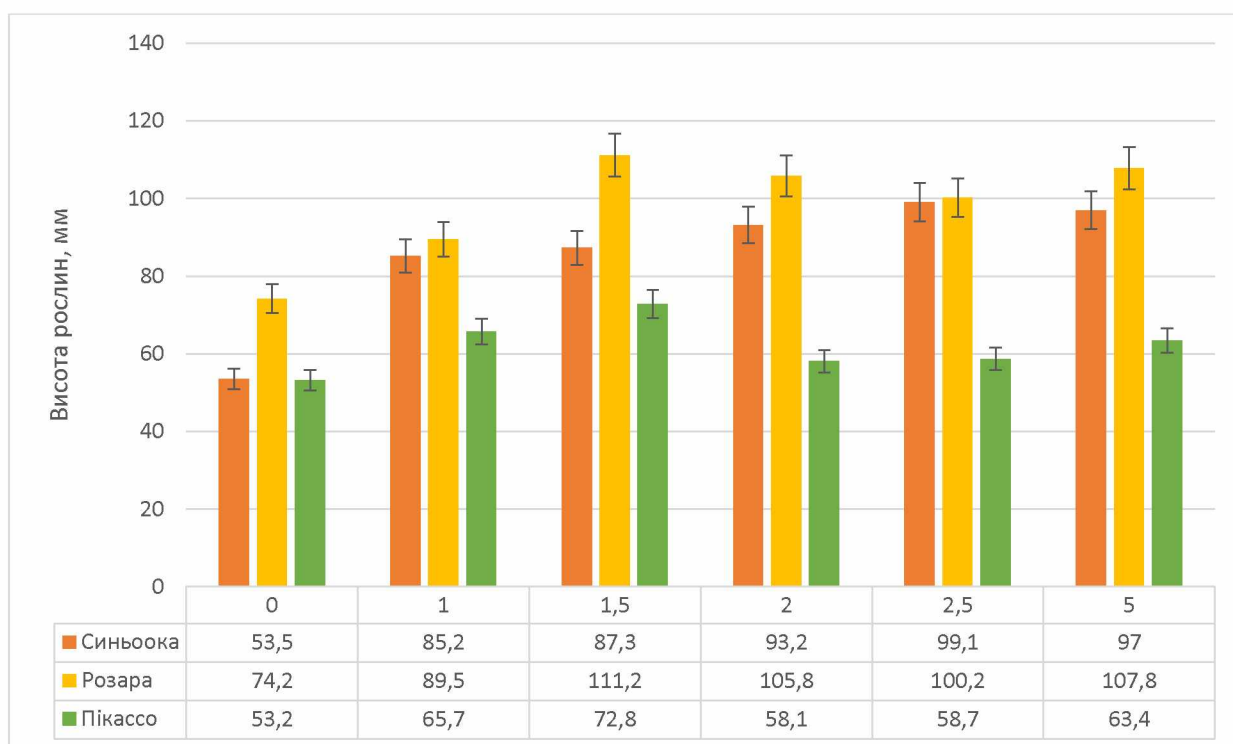


Рис. 3.4 Вплив вітамінного компонента живильного середовища на висоту рослин картоплі в культурі in vitro

Для картоплі сорту Синьоока хороші показники розвитку надземної частини рослин (висота та кількість міжвузлів) були відмічені за використання широкого діапазону концентрацій вітамінів від 2 до 5 мкМ. Максимальні показники розвитку були відмічені за концентрації 2,5 мкМ, при

цьому висота рослин становила $99,1 \pm 0,5$ мм, на рослині формувалося по $7,6 \pm 0,2$ міжвузля.

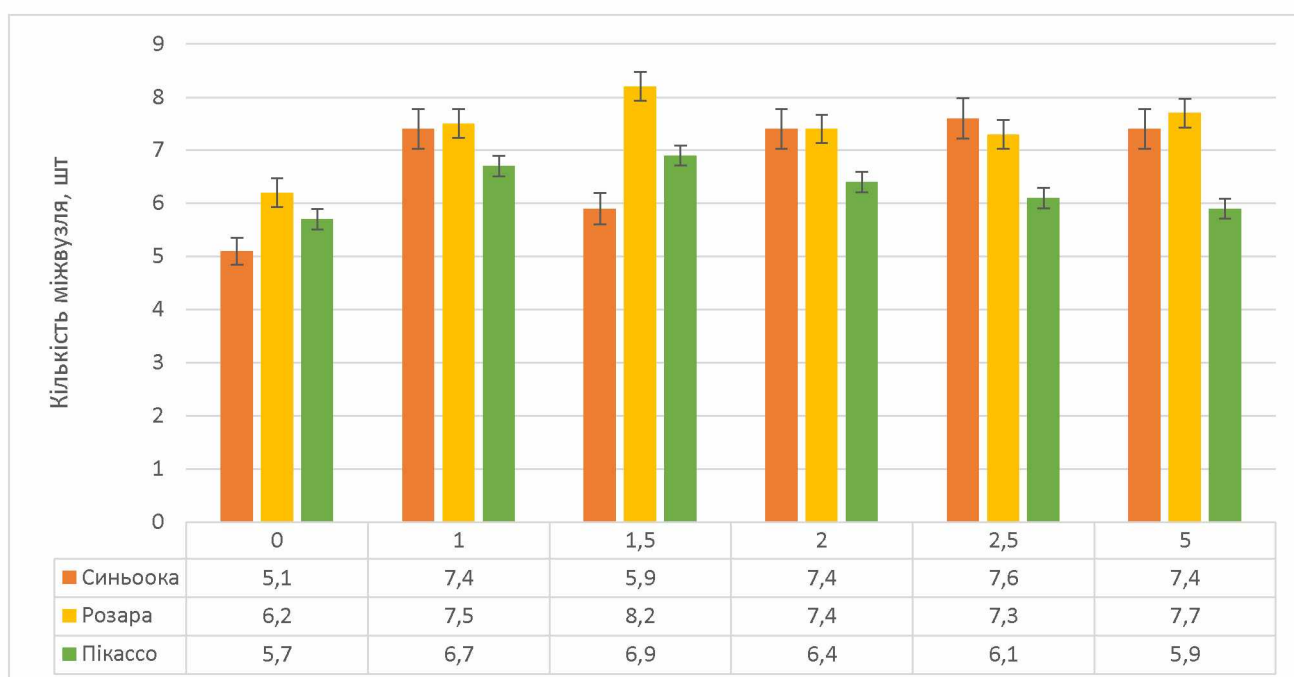


Рис. 3.5 Вплив вітамінного компонента живильного середовища на число міжвузлів рослин картоплі в культурі *in vitro*.

Максимальна висота регенерантів сорту картоплі Розара була відмічена при використанні комплексу вітамінів у концентрації 1,5 мкМ. При цьому максимальна висота рослин становила $111,2 \pm 0,6$ мм.

Крім цього для сорту Розара із-за збільшення концентрації вітамінів до 5 мкМ у регенерантів формувалися рослини вищі за 100 мм, які склалися з 7-8 міжвузлів, спостерігалось витягування рослин за рахунок збільшення зони міжвузлів, що на етапі власне розмноження полегшує технічне проведення робіт з мікроживцювання.

Регенеранти картоплі Пікассо на всіх вивчених варіантах поживних середовищ мали найменшу висоту рослин порівняно з іншими сортами. Максимальні показники розвитку вегетативної частини рослин були відмічені при використанні комплексу вітамінів у концентрації 1,5 мкМ. При даній концентрації була відзначена максимальна висота рослин $72,8 \pm 0,5$ мм,

максимальне число міжвузлів на рослині не перевищувало $6,9 \pm 0,2$ шт. Крім цього, відмічалось потовщення стебла, формувалося листя більшого розміру і темнішого кольору. При зниженні концентрації вітамінів у живильному середовищі до 0 і підвищенні до 5 мкМ для даного сорту відзначалося уповільнення ростових процесів і скручування листя рослини.

Для успішного проведення етапу адаптації необхідно отримати рослини з добре розвинутою кореневою системою. Для успішного вкорінення рослин картоплі в культурі *in vitro* застосовують різні регулятори росту ауксинової природи. Відомо, що вітаміни групи В є природними попередниками метаболітів, які відповідають за синтез у рослині індолілоцтової кислоти. Таким чином, введення в живильне середовище вітамінів в оптимальній для рослини концентрації стимулює розвиток кореневої системи. За використання поживних середовищ без внесення вітамінів спостерігалось зменшення таких показників ризогенезу, як кількість і середня довжина коренів, для всіх досліджених сортів картоплі (рис. 3.6 та 3.7).

З усіх вивчених сортів картоплі Пікассо виявився найбільш чутливим до відсутності вітамінів, відбувалося зниження показників ризогенезу до $13,2 \pm 0,4$ шт/експл. кореня, середня довжина яких не перевищувала $13,5 \pm 0,5$ мм. Максимальні показники розвитку кореневої системи для даного сорту були зареєстровані за використання 1,5 мкМ вітамінного комплексу. Високі концентрації 2,5-5 мкМ так само знижували показники укорінення рослини.

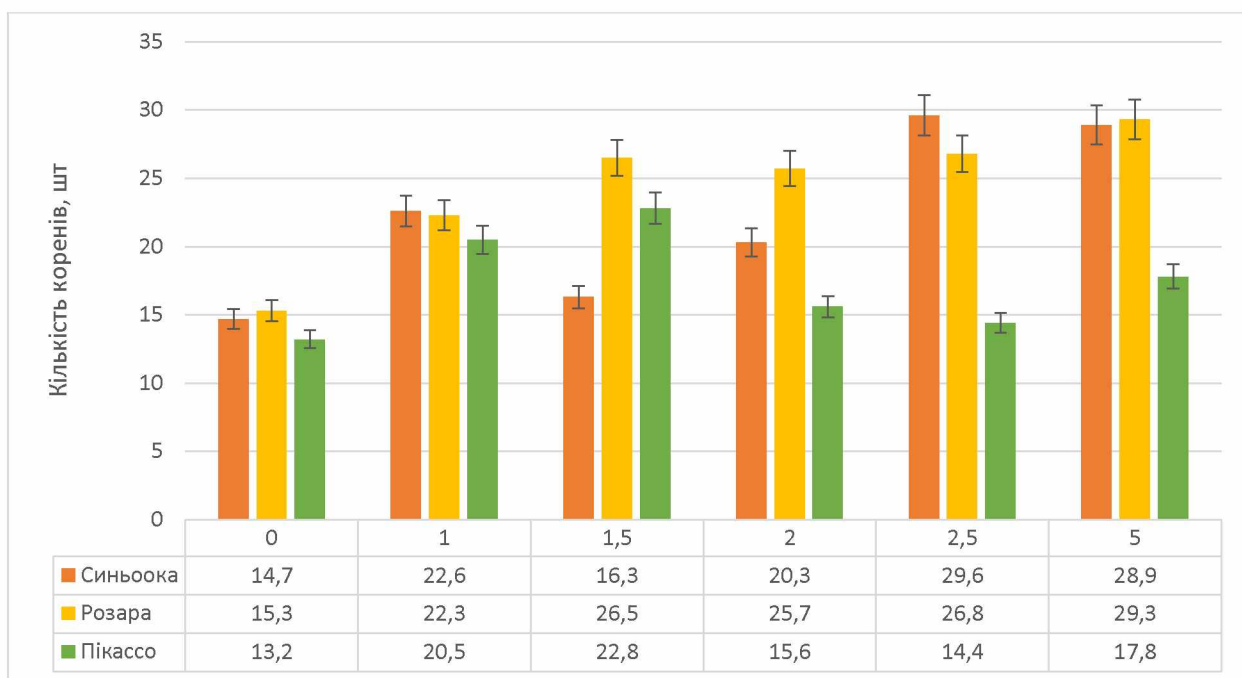


Рис. 3.6 Вплив вітамінного компонента живильного середовища на кількість коренів рослин картоплі в культурі *in vitro*

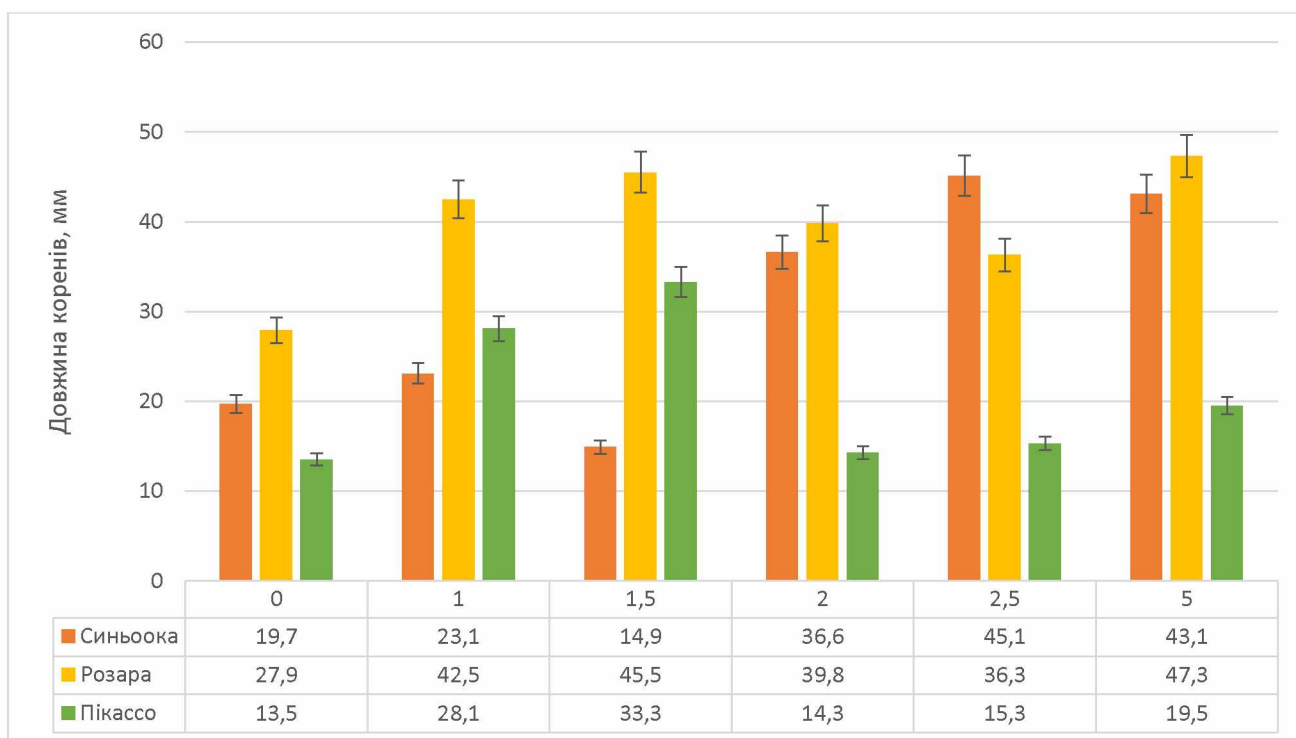


Рис. 3.7 Вплив вітамінного компонента поживного середовища на довжину коренів рослин картоплі в культурі *in vitro*

Для картоплі сорту Синьоока оптимальною виявилася концентрація 2,5 мкМ. При цьому на рослині формувалося по $29,6 \pm 0,7$ шт/експл. коренів, середня довжина яких становила $45,1 \pm 0,8$ мм. За даних характеристик кореневої системи рослини успішно проходять етап адаптації з використанням гідропонних систем, рослини легко закріпити у вегетаційній касеті.

Рослини картоплі селекції Розара позитивно відгукувалася на високі концентрації вітамінів у живильному середовищі. Так, у регенерантів даного сорту за 5 мкМ вітамінів формувалися рослини з добре розвиненою кореневою системою - $29,3 \pm 0,6$ шт/експл. коренів, середня довжина яких становила $47,3 \pm 0,4$ мм. При цьому відбувалося потовщення коренів та активне формування корневих волосків, що в подальшому забезпечує успішну адаптацію до нестерильних умов вирощування *in vivo*.

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що різні генотипи картоплі неоднозначно реагують на внесення вітамінного компонента в живильне середовище. Необхідно використовувати середовища, які містять індивідуальні для кожного сорту концентрації, що дасть змогу отримати максимальні морфологічні характеристики розвитку рослин.

ВИСНОВКИ

В кваліфікаційній роботі досліджено вплив біологічного препарату Азотофіт-р на ріст та розвиток картоплі в умовах клонального мікророзмноження. Отримані результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. Встановлено, що концентрація біопрепарату Азотофіт-р 2 мл/л поживного середовища МС є оптимальною для вирощування картоплі методом *in vitro*.

2. Оптимізовано поживні середовища за вмістом вітамінного компонента для пробіркових рослин-регенерантів у культурі *in vitro*. У досліджуваних регенерантів картоплі за використання різних концентрацій вітамінів у живильному середовищі були відзначені морфологічні параметри розвитку, специфічні для кожного сорту.

3. З урахуванням сортових відмінностей встановлені основні параметри росту. Для картоплі сорту Синьоока максимальні параметри розвитку рослин спостерігалися за використання вітамінного компонента в концентрації 2,5 мкМ, для картоплі сорту Пікассо - 1,5 мкМ. Максимальні показники розвитку вегетативної частини рослини для сортів картоплі Розара було отримано за додавання в живильне середовище вітамінів у концентрації 1,5 мкМ. Найкращі показники ризогенезу для сорту Розара були відмічені за 5 мкМ вітамінного комплексу.

4. Доведено ефективність стимулюючого впливу біологічного препарату Азотофіт-р на морфологічні характеристики рослин картоплі (ріст і розвиток кореневої системи). Рекомендовано використовувати цей препарат для підвищення продуктивності та якості урожаю картоплі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ajijah N., Fiodor A., Pandey A.K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity*. 2023. Vol. 15, No. 1. P. 112.
2. Ali S., Charles T.C., Glick B.R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Biochem Plant Physiology and Biochemistry*. 2014. Vol. 80. P. 160-167.
3. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 971.
4. Andrews M., Andrews M.E. Specificity in Legume-Rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, No. 4. P. 705.
5. Athira K.S., Kumari K.U., Rao M.P. Growth and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by dates of planting and genotypes. *The Pharma Innovation Journal*. 2021. Vol. 10, No. 7. P. 1409-1412.
6. Ayyaz K., Zaheer A., Rasul G., Mirzam M.S. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. *Brazilian journal of microbiology*. 2016. V. 47. P. 542-550
7. Barnawal D., Bharti N., Maji D. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiol Biochem*. 2012. Vol. 58. P. 227-235.
8. Bashan Y., de - Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P. Advances in plantgrowth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 2014. No. 378. P. 1-33.
9. Basu A., Prasad P., Das S.N. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*. 2021. Vol. 13, No. 3. P. 1140.

10. Bellabarba A., Fagorzi C., DiCenzo G.C. Deciphering the Symbiotic Plant Microbiome: Translating the Most Recent Discoveries on Rhizobia for the Improvement of Agricultural Practices in Metal-Contaminated and High Saline Lands. *Agronomy*. 2019. Vol. 9, No. 9. P. 529
11. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009. Vol. 68, No. 1. P. 1-13.
12. Bhat M.A., Mishra A.K., Jan S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Plant Health: A Perspective Study of the Underground Interaction. *Plants*. 2023. Vol. 12, No. 3. P. 629.
13. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012. Vol. 28. P. 1327–1350.
14. Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol*. 2001. Vol. 4, No. 4. P. 343-350.
15. Bowles T.M., Acosta-Martínez V., Calderón F., Jackson L.E. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*. 2014. Vol. 68. P. 252-262.
16. Brown P., Saa S. Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. P. 671.
17. Cao X., Fordham I., Douglass L., Hammerschlag F. Su-crose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from in vitro propagated high-bush blueberry shoots. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult*. 2003. V. 75. P. 255-259.
18. Cassan F., Perrig D., Sgroy V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil biology*. 2009. Vol. 45, No. 1. P. 28-35.

19. Chang W.T., Chen Y.C., Jao C.L. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresour Technol.* 2007. Vol. 98, No. 6. P. 1224–1230.
20. Chebotar V.K., Malfanova N.V., Shcherbakov A.V. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2015. Vol. 51. P. 271-277.
21. Clapa D., Al F. The use of zeatin as growth regulator for the micropropagation of some highbush blue-berry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. *Bul. Univ. Esti. Agr. Esi Med. Vet. Cluj-Napoca. Ser. Hort.* 2006. V. 63. P. 400
22. Cocking E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil.* 2003. Vol. 252. P. 169-175.
23. Compant S., Duffy B., Nowak J. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2005. Vol.71, No. 9. P. 4951-4959.
24. Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moënne-Loccoz Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2009. Vol. 48, No. 5. P. 505–512.
25. Delfin E.F., Rodriguez F.M., Paterno E.S. Biomass partitioning, yield, nitrogen and phosphorus uptake of PGPR inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) under field condition. *Philippine Journal of Crop Science (PJCS).* 2015. Vol. 40, No. 2. P. 59-65.
26. Fufa M., Mulugeta D. Microtuber of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Advances of Crop Science and Technology.* 2014. P. 122.
27. Gamalero E., Glick B.R. Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiol.* 2015. Vol.169, No. 1. P. 13-22.
28. Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research.* 2007. P. 329–339.

29. Goswami D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C., Tejada M.M. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food Agric.* 2016. Vol. 2. P. 1127500
30. Gray E.J., Smith D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry.* 2005. Vol. 37, No. 3. P. 395-412.
31. Grosbeak A., Napora A., Kacprzak M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecol Eng.* 2015. Vol. 84. P. 22–28.
32. Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol.* 2015. Vol. 7. P. 1-6.
33. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 117-153.
34. Habibi S., Djedidi S., Prongjunthuek K., Mortuza M.F. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil.* 2014. Vol. 379. P. 51–66.
35. Jaakola L. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bil-berry and lingonberry microshoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2001. V. 66. P. 73-77.
36. Jin H., Wang H., Zhand Y., Hu T., Lin Z., Liu B., Ma J., Wang X., Liu Q., Lin X., et al. Description of *Azotobacter chroococcum* sudsp. *isscasi* subsp. nov. isolated from paddy soil and establishment of *Azotobacter chroococcum* sudsp. *chroococcum* subsp. *nov* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020. P. 5-6
37. Karagöz F.P., Dursun A., Kotan R. Assessment of the effects of some bacterial isolates and hormones on corm formation and some plant properties in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Agricultural Sciences.* 2016. Vol. 22. P. 500-501.

38. Kaume L., Howard L.R., Devareddy L. The blackberry fruit, its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Agric Food Chem.* 2011. № 60, P. 57-16
39. Kivi M.P., Hokmalipour S., Darbandi M.H. Nitrogen and phosphorus use efficiency of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research.* 2014. Vol. 2. P. 1038-1050.
40. Koleva-Gudeva L., Mitrev S., Trajkova F., Ilievski M. Micropropagation of potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic Journal of Biology.* 2012. Vol. 8 (3). P. 45–49.
41. Kolodziejczyk M. Effectiveness of nitrogen fertilization and application of microbial preparations in potato cultivation. *Turk J Agric For.* 2014. Vol. 38, No. 3. P. 299-310.
42. Kumar R., Seneviratne G., Zavahir J.S. Sustaining Productivity Through Integrated Use of Microbes in Agriculture. *Role of Microbial Communities for Sustainability, Microorganisms for Sustainability.* Springer, Singapore, 2021. Vol. 29. P. 109-145.
43. Kumar V., Singh P., Jorquera M.A., Sangwan P. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2013. Vol. 29. P. 1361-1369.
44. Kumari B., Mallick M.A., Solanki M.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Modern Prospects for a Sustainable Agriculture. In: R. Ansari, I. Mahmood (eds) *Plant Health Under Biotic Stress.* Springer, Singapore. 2019. Vol. 2. P.109-127.
45. Laid B., Kamel K., Mouloud G. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on in vitro Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth Parameters and Biological Control Mechanisms. *Advances in Microbiology.* 2016. Vol. 6. P. 677-690.

46. Lavakush J., Yadav J., Verma P. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering*. 2014. Vol. 62. P. 123-128.
47. Lindström K., Mousavi S.A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*. 2019. Vol. 13, No. 5. P. 1314-1335.
48. Lopez-Perez A. J., Carreno J., Matrinez-Cutillas A., Dabauza M. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*. 2005. 44, №2. P. 79-85.
49. Lucas J.A., Solano B.R., Montes F., Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research*. 2009. Vol. 114, No. 3. P. 404-410.
50. Majeed A., Abbasi M.K., Hameed S. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 198.
51. Mohammadi K., Yousef S. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. *ARPN J Agric Biol Sci*. 2012. Vol. 7, No. 5. P. 307-316.
52. Naseem H., Ahsan M., Shahid M.A., Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of basic Microbiology*. 2018. Vol. 58, No. 12. P. 1009-1022.
53. Naseem H., Bano A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*. 2014. Vol. 9. P. 689-701.
54. Naveed M., Lathif N. A., Mona R., Muhamad N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture. *Indian Journal of Agricultural Research*. 2019. Vol. 53, No. 1. P. 1-7.
55. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 33. P. 1-16.

56. Palsaha S., Paul A.K. Induction of mutation in *Azotobacter chroococcum* MAL-201 for improvement of P (3HB) production. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*. 2003. Vol. 62, No. 3-4. P. 203-215.
57. Perez-Montano F., Alias-Villegas C., Bellogin R.A., Perez-Montano F. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 2014. Vol. 169, No. 5-6. P. 325-336.
58. Qaisrani M.M., Mirza M.S., Zaheer A., Malik K.A. Isolation and identification by 16s rRNA sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2014. Vol. 51, No. 1. P. 91-99.
59. Raaijmakers J.M., Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. 2012. Vol. 50. P. 403-424.
60. Reetha S., Bhuvaneshwari G., Thamizhiniyan P. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2014. Vol. 3, No. 2. P. 568-574.
61. Richardson, A.E. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*. 2011. Vol. 349. P. 121-156.
62. Saharan B.S., Nehra V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*. 2011. Vol. 21. P. 30.
63. Satyaprakash M., Nikitha T., Reddi E.B. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017. Vol. 6, No. 4. P. 213-214.
64. Shahid M., Hameed S., Imran A. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 28, No. 8. P. 2749-2758

65. Sharad T., Shanker P., Tripathi M. Effects of genotype and culture medium on in vitro androgenesis in soybean (*Glycine max* Merr.). *Indian Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 3, № 3. P. 441–444.
66. Sivasakthi S., Usharani G., Saranraj P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural*. 2014. Vol. 9, No. 16. P. 1265-1277.
67. Smagula J.M., Litten W., Loennecker K. Diammonium Phosphate Application Date Affects *Vaccinium angustifolium* Ait. Nutrient Uptake and Yield. *Small Fruits Review*. 2004. Vol. 3, № 1/2. P. 87–94.
68. Sturz A.V., Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil ecology*. 2000. Vol. 15, No. 2. P. 183-190.
69. Tetsumura T., Matsumoto Y., Sato M. et al. Evaluation of basal media for micropropagation of four high-bush blueberry. *Sci. Hortic*. 2008. V. 119. P. 72-74.
70. Theis K.R., Dheilly N.M., Klassen J.L. Getting the hologenome concept right: An eco—Evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *Msystems*. 2016. Vol. 1, No. 2. P. e00028-16.
71. Tilman, D., Cassman K., Matson P. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 671-677.
72. Trivedi P., Pandey A., Palni M.S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 21, No. 6. P. 941-945.
73. Tsukanova K.A., Chebotar V.K., Meyer J.M. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African journal of botany*. 2017. Vol. 113. P. 91-102.
74. Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*. 2003. Vol. 255, No. 2. P. 571-586.

75. Wheatley R.M., Poole P.S. Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS microbiology reviews*. 2018. Vol. 42, No. 4. P. 448-461.
76. Yadav A.N., Verma P., Singh B. Plant growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Adv Biotech & Micro*. 2017. Vol. 5, No. 5. P. 6-10.
77. Yarte M.E., Llorente B.E., Larraburu E.E. Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its in vitro rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2022. Vol. 151, No. 2. P. 265-274.
78. Yarte M.E., Santos M.P., Gismondi M.I. Evaluation of native plant growth-promoting rhizobacteria in *Handroanthus impetiginosus* micropropagation. *Trees*. 2022. P. 1-12.
79. Yasmin F., Othman R., Vijayan H., Nazmul M.H. Response of sweet potato to application of PGPR and N fertilizer. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021. P. 10799-10812.
80. Zhao X., Wang Y., Shang Q., Li Y. Collagen-like proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) are required for biofilm formation and adhesion to plant roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PloS one*. 2015. Vol. 10, No. 2. P. e0117414.
81. Крупа, О. М., Тринько Р. І., Біттер О. А. Стан та перспективи розвитку картоплярства у Львівській області: Львів, 2010. С. 4–15
82. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин : монографія. Київ : Наукова думка, 2005. 271 с.
83. Маційчук, В. М., Саюк О. А., Кропивницький Р. Б., Шегеда А. Ф. Особливості проведення експертизи сортів картоплі (*Solanum tuberosum* L.) на відмінність, однорідність та стабільність. *Вісник ЖНАЕУ*. 2014. № 2 (42). С. 136–144
84. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.
85. Теслюк, П. С., Молоцький М. Я., Власенко М. Ю. Захист картоплі від шкідників та хвороб. *Насінництво картоплі*: Біла Церква. 2000. С. 137–138

86. Каталог біологічних препаратів. URL: https://btu-center.com/upload/publication/2022/Cataloge_BTU_2022_WEB.pdf (дата звернення 19.06.2024)
87. Azobacter chroococcum. Abis encyclopedia. URL: https://www.tgw1916.net/Pseudomonas/azotobacter_chroococcum.html (дата звернення 19.06.2024)
88. Azotobacter chroococcum. URL: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Azotobacter_chroococcum (дата звернення 19.06.2024)